

Aus dem Institut
für Biochemie und Endokrinologie
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Langzeitkultur primärer Lutealzellen
des bovinen Corpus luteum
in einem kontinuierlichen Bioreaktor
und Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(Fachbereich Biologie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christoph Giese
aus Ehringshausen, Hessen

Gießen 1999

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Clauß

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Clauß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Sernetz

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.1999

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Primärkultur boviner Lutealzellen	2
1.2	Entwicklung eines Bioreaktors zur Kultur von primären Lutealzellen	2
1.3	Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro	3
2	Material und Methoden	4
2.1	Inkulturnahme endokriner Zellen aus dem Corpus luteum des Rindes	4
2.1.1	Organpräparation und Isolierung der Zellen	4
2.1.2	Primärkultivierung	5
2.2	Charakterisierung der Lutealzellen	7
2.2.1	Bestimmung der Progesteronproduktion in vitro	7
2.2.2	Mikroskopische Charakterisierung der Zellen	8
2.2.3	Kryokonservierung primärer Lutealzellen	15
2.2.4	Anzucht primärer Lutealzellen aus kryokonservierten Proben	15
2.3	Bioreaktorentwicklung zur kontinuierlichen Langzeitkultur adhärenter Zellen im Labormaßstab	16
2.3.1	Bioreaktortechnik	16
2.3.2	Bioreaktorumgebung	16
2.3.3	Hohlfasermodule	17
2.3.4	Wirbelschichtmodule	20
2.3.5	Meßanordnung	23
2.3.6	Prozeßkontrolle	24
2.3.7	Enzymatische Bestimmung von Glucose und Lactat im Kulturmedium	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Primärkultur und Charakterisierung der Lutealzellen	30
3.1.1	Gewebepräparation	30
3.1.2	Allgemeine Kultivierung der Lutealzellen	32
3.1.3	Cytologische Charakterisierung der Lutealzellen	35
3.1.4	Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro	39
3.1.5	Isolierung von Lutealzellen durch Dichtegradientenzentrifugation	43
3.1.6	Progesteronproduktion in Abhängigkeit von Kulturmedium und Mediumsupplementen	45
3.1.7	Langzeitkultur	48
3.2	Optimierung der Regelung für O ₂ und pH im Bioreaktor	52
3.3	Kontinuierliche Kultur im Bioreaktor	53
3.3.1	Kontinuierliche Kultur im Hohlfasermodule	53
3.3.2	Kontinuierliche Kultur im Wirbelschichtmodule	57

4	Diskussion	65
4.1	Endokrinologie der Fortpflanzung des Rindes	65
4.2	Bildung und Wachstum des Corpus luteum	68
4.3	Die Präparation von Lutealzellen aus dem Corpus luteum	70
4.4	Primärkultur der Lutealzellen	71
4.4.1	Verwendete Kulturmedien und fetales Kälberserum als Mediumzusatz	71
4.4.2	Charakterisierung der Lutealzellen	73
4.4.3	Eigenschaften der Lutealzellen in klassischer batch-Kultur	74
4.4.4	Stimulation und Inhibition der Lutealzellkultur	75
4.4.5	Progesteronproduktion der Lutealzellkultur	76
4.5	Bioreaktorentwicklung	77
4.5.1	Kontinuierliche Kultur der Lutealzellen in Hohlfaser- und Wirbelschicht-Modulen	80
5	Zusammenfassung	84
6	Summary	85
7	Literatur	86
	Anhang I, Abkürzungen	96
	Anhang II, Rezepturen, Geräte, Reagenzien	98
	Anhang III, Primärdaten, Tabellenkalkulationen	106

1 Einleitung

Die Kultur von Zellen aus Säugetieren gewinnt in der Biotechnologie zunehmend an Bedeutung. Sie entwickelt sich in den Bereichen der Grundlagenforschung, der medizinischen Anwendung und der produktionsorientierten Biotechnologie. Mit dem steigenden Bedarf an zellulären Produkten wie monoklonalen Antikörpern, rekombinanten Proteinen oder Wachstumsfaktoren wächst das Interesse an produktionsoptimierten Säugerzellkulturen.

Mit dem "Tissue Engineering" etablieren sich außerdem in vitro-Systeme mit Zellen und Geweben zur Untersuchung organspezifischer Funktionen als Ersatz zum Tierversuch im Wirkstoff-Screening und in Toxizitätsstudien. Die Entwicklung von Organersatzsystemen für den Einsatz am Menschen stellt schließlich den zur Zeit höchsten Stand der Zellkulturtechnik dar. Erste Produkte sind bereits im Stadium der klinischen Anwendung. So werden extrakorporale Leberersatzsysteme mit primären Hepatocyten des Schweines in Hohlfaserbioreaktoren als "Artificial Organs" erfolgreich bei akutem Leberversagen für mehrere Tage zur Überbrückung der Wartezeit bis zur Transplantation eines Spenderorgans eingesetzt (NYBERG, 1999; GERLACH, 1996).

Für die Untersuchung von zell- und organspezifischen Funktionen ist die Kultur primärer und ausdifferenzierter Zellen notwendig. Die Primärzellkultur stellt vollkommen andere Anforderungen an die verwendeten Kulturmedien und Kultursysteme als die Kulturen etablierter Zelllinien.

Die Kulturmedien für die klassische Zellkultur wurden in den frühen fünfziger Jahren entwickelt und sind für schnell proliferierende Tumorzellen optimiert. Zur Kultur primärer Zellen und zur Untersuchung der gemäß ihrer Differenzierung ausgebildeten spezifischen Funktionen sind diese Kulturmedien zum Teil ungeeignet. Die Entnahme der Zellen aus ihrem Gewebeverband, der Verlust ihrer umgebenden, spezifischen, extrazellulären Matrix und nicht zuletzt die Kultur auf einer einfachen Kunststofffläche und in unzureichendem Kulturmedium führen meistens zu einer raschen Dedifferenzierung. Die Proliferation der Zellen ist in vielen Fällen zwar ausreichend und eine Passagierung möglich, doch mit zunehmender Kulturdauer verschwinden die spezifischen zellulären Merkmale, deren Struktur oder Funktion letztlich untersucht werden soll.

Neben der individuellen Optimierung der Kulturmedien ist die Entwicklung geeigneter Kulturverfahren und Kultursysteme notwendig. Auch sie müssen an die spezifischen Anforderungen der zu kultivierenden Zellen angepaßt werden. Solche technischen Systeme, als Bioreaktoren bezeichnet, gewährleisten definierte und konstante Kulturbedingungen und erlauben eine Automatisierung des Kultivierungsprozesses.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Inkulturnahme primärer endokriner Zellen des Gelbkörpers, die Etablierung ihrer Langzeitkultur und die Untersuchung der endokrinen Funktionen. In einem speziell für die Kultur der Lutealzellen zu entwickelnden Bioreaktor sollte die Progesteronproduktion von Corpus luteum Zellen unter definierten kontinuierlichen Bedingungen untersucht werden.

1.1 Primärkultur boviner Lutealzellen

Zur Kultur wurden endokrin aktive Lutealzellen aus dem Corpus luteum (CL) des Rindes gewählt, welche die Fähigkeit zur Synthese von Progesteron besitzen und sich über Hormone in ihrem Wachstums- und Produktionsverhalten steuern lassen. Sie sind zur Präparation und zur Inkulturnahme besonders gut geeignet, da sie in einer zeitlich begrenzten Phase trotz ihres Differenzierungsgrades ein massives Teilungswachstum, gefolgt von einer lang anhaltenden Phase mit Progesteronproduktion zeigen.

Die Lutealzellkultur ist bereits für den Menschen und einige Säugetierarten etabliert worden. Diese Kulturen beschränken sich allerdings nur auf wenige Tage Dauer. So haben CARRASCO ET AL. (1996) die Fähigkeit verschiedener isolierter Subtypen humaner Lutealzellen auf ihre Fähigkeit zur Steroidsynthese untersucht. WOODRUFF ET AL. (1993) haben Ovarial- und Lutealzellen verschiedener Säuger in definierten Medien kultiviert. MILLER AND OBASIOLU (1996) untersuchten den Einfluß von Insulin und Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor (IGF) auf die Progesteronproduktion an Lutealzellen des Kaninchen. Umfangreiche methodische Entwicklungen der Lutealzellpräparation wurden an der Ratte etabliert (GU AND GIBORI, 1995; SANDERS AND STOUFFLER, 1995; NELSON ET AL., 1992; MAGOFFIN AND ERICKSON, 1988; MCNAMARA ET. AL., 1980). Auch die Kultur und Regulation boviner Lutealzellen in vitro wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (DEL VECCHIO ET AL.:1995; O'SHAUGHNESSY AND WALTHES, 1985; ALILA AND HANSEL, 1984).

Aufbauend auf den in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Zellpräparation und zur Kultur der Lutealzellen sollte in dieser Arbeit eine Methode für eine Massenanzucht der primären Zellen entwickelt werden, die es ermöglicht, eine ausreichende Zellzahl für die Kultur in einem geeigneten Bioreaktor bereitzustellen.

1.2 Entwicklung eines Bioreaktors zur Kultur von primären Lutealzellen

Parallel zur Etablierung der Primärzellkultur sollte ein Bioreaktor entwickelt werden, der an die spezifischen Eigenschaften der präparierten Lutealzellen angepaßt ist und über einen längeren Zeitraum eine kontinuierliche Kultur dieser Zellen unter konstanten Milieubedingungen ermöglicht. Die Konzeption und Entwicklung der verwendeten Bioreaktoren basiert auf den reaktortechnischen Entwicklungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Sernetz (OH, 1993; KEINER, 1991; RAAB, 1988). Unter kontinuierlichen Bedingungen findet ein permanenter Austausch des Kulturmediums statt, der zu einem Fließgleichgewicht führt und die ausreichende Zufuhr von Substraten und die Ausschwemmung von Produkten mit potentiell hemmenden Effekten gewährleistet. Im Vergleich mit den verschiedenen biotechnologischen Kultivierungsverfahren simuliert ein kontinuierlich betriebener Bioreaktor die Bedingungen in vivo am besten. Die meisten Primärzellen müssen adhärent kultiviert werden. Der Bioreaktor muß daher bei insgesamt relativ kleinem Kulturvolumen über eine große, für die Adhäsion der Zellen geeignete Fläche im Kulturmodul verfügen. Die modulare Konzeption des Bioreaktors ermöglicht die Anwendung von Hohlfaser-, Festbett- oder Wirbelschichtkultur.

1.3 Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro

Für die Langzeituntersuchung von Organfunktionen in vitro ist die Einstellung von konstanten und definierten Kultivierungsbedingungen von zentraler Bedeutung. Der kontinuierlich betriebene Bioreaktor gewährleistet die erforderliche Homöostase in einem stabilen Fließgleichgewicht.

In klassischer Kultur sowie im kontinuierlichen Bioreaktor sollte die Fähigkeit der Lutealzellen zur Progesteronproduktion in vitro untersucht und optimiert werden. Dabei dienen die erzielten Produktionsraten an Progesteron als Maß der Zellvitalität in Kultur und zur Beurteilung der Güte der biotechnologischen Prozeßführung. Nach Etablierung der kontinuierlichen Kultur sollten darüber hinaus regulatorische Mechanismen der endokrinen Funktion über exogene Stimulation und Inhibition durch Hormone getestet werden.

2 Material und Methoden

Zugunsten des besseren Verständnisses sind die im folgenden erwähnten Geräte und Reagenzien in Kurzform beschrieben. Ausführlichere Produktbeschreibungen, Rezepturen für Lösungen sowie die Angabe der Bezugsquellen sind im Anhang II zu finden. Bei gleichen Produkten verschiedener Hersteller sind zur besseren Unterscheidung die Hersteller in Klammern angegeben. Verwendete Abkürzungen werden an der Stelle der Ersterwähnung ausgeschrieben und sind darüber hinaus im Anhang I aufgelistet.

2.1 Inkulturnahme endokriner Zellen aus dem Corpus luteum des Rindes

Die im folgenden beschriebene Präparation und Kultur von primären Lutealzellen ist an die in der Literatur beschriebenen Protokolle zur Isolation und Kultur primärer Ovarialzellen (MAGOFFIN AND ERICKSON, 1988; MCNAMARA ET. AL., 1980) und primärer Hepatocyten (DOYLE ET. AL., EDS., 1995; KOEBE ET. AL., 1994) verschiedener Säugetierarten angelehnt.

2.1.1 Organpräparation und Isolierung der Zellen

Für die Gewinnung boviner Lutealzellen für die Primärkultur wurden Ovarien aus der Rinderschlachtung verwendet. Am Gießener Schlachthof (Fa. Färber & Co.) wurden Uteri mit Ovarien aus dem Schlachtvorgang unsteril entgegengenommen, daraus geeignete Ovarien freipräpariert und in eisgekühltem, Amphotericin B-haltigen, isotonischen Phosphatpuffer (PBS, Ca^{2+} -frei, geringe Mg^{2+} -Konzentration) für den Transport gelagert. Die ausgewählten Ovarien zeigten keine sichtbaren pathologischen Veränderungen und waren frei von Superovulationen sowie Ovarialzysten. Es wurden ausschließlich Corpora lutea aus dem frühen und späten Zyklus von nichtgraviden Rindern verwendet.

Die weitere Präparation der Ovarien erfolgte unter sterilen Bedingungen im Labor. Zunächst wurden die Corpora lutea aus den Ovarien freipräpariert, ihre bindegewebige Kapsel entfernt und mehrfach mit PBS gespült. In peripher liegende Blutgefäße wurden zunächst 10 ml steriler PBS zum Ausspülen des Blutes injiziert. In einem zweiten Schritt wurde mit 10 ml Ca^{2+} -haltiger PBS (PBS-Ca, erhöhte Mg^{2+} -Konzentration) nachgespült, um das Milieu für den folgenden enzymatischen Verdau vorzubereiten. Anschließend wurden 15 ml proteolytische Collagenaselösung (Typ I, 150 U/ml in PBS-Ca) injiziert und die Präparate in einer feuchten sterilen Kammer für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach enzymatischem Verdau wurde das Gewebe unter Zugabe von Kulturmedium in kleine Stücke zerzupft und mehrfach durch ein Edelstahlsieb, unter Abtrennung bindegewebiger Anteile und größerer Zellaggregate, passiert (Maschenweite 150 µm). Die dissoziierten Zellen und Zellaggregate wurden dabei in Kulturmedium suspendiert. Die Prozedur von Passieren und Suspendieren wurde mehrfach wiederholt, ohne dabei ein Gesamtvolumen von 50 ml zu überschreiten. Die Lutealzellen wurden durch Zentrifugation bei 25 - 30 g für 15 min in verschlossenen Zentrifugenröhrchen (Tischzentrifuge Hettich, 600 U/min, 8 °C) aus der Primärsuspension abgetrennt. Nach Suspendierung der sedimentierten Zellen in

Kulturmedium (insgesamt 30 ml je Gelbkörper) wurde die Qualität der Isolation unter dem Mikroskop überprüft sowie eine Abschätzung der Zelldichte mit einer Bürker-Zählkammer vorgenommen. Anschließend wurden 15 ml Suspension in collagen-beschichtete Kulturflaschen (T-Flaschen, 75 cm² bzw. 80 cm²) aliquotiert. Nach 24 h und 48 h Inkubation im Brutschrank konnte die Adhäsion der Zellen mikroskopisch überprüft, und schließlich durch vorsichtiges Dekantieren das Medium entfernt und durch 15 ml frisches Medium ersetzt werden.

2.1.2 Primärkultivierung

Die primären Lutealzellen wurden in unterschiedlichen Kulturmedien gehalten. Dabei handelt es sich um konfektionierte Minimalmedien verschiedener Hersteller mit Modifizierungen nach Earle bzw. Dulbecco (Minimal-Essential-Medium, MEM). Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen von Primärzellen wurden die Medien durch verschiedene Zusätze für die präparierten Lutealzellen optimiert. Für die Standardkultur wurde zunächst ein MEM mit der Modifizierung nach Earle (MEM-E, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet, dem 5 % (v/v) (4,65 % ¹) fetales Kälberserum (FKS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 10 ml Penicillin/Streptomycin - Lösung (1 kU bzw. 1 mg in isotonischer NaCl-Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1 ml Amphotericin B - Lösung (259 µg, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) sowie ein Analogon des luteinisierenden Hormons (LH), das humane Choriongonadotropin (hCG, 2 ml mit 1,25 kU/ml, Ovogest 5000, Intervet) pro Kulturflasche mit 500 ml zugesetzt waren. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einer CO₂-Atmosphäre von 5 % (v/v) und mindestens 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Dadurch war ein stabiler pH-Wert von 7,4 gewährleistet. In fortgeschrittenen Kulturexperimenten ist dieses Medium durch ein MEM mit der Modifizierung nach Dulbecco (D-MEM, PAA Laboratories GmbH) ersetzt worden, welches sich im wesentlichen durch den Zusatz von Na-Pyruvat und den höheren Gehalt an Glutamin vom erstgenannten unterscheidet. Dieses Medium wurde ebenso mit Penicillin/Streptomycin-Lösung, Amphotericin B sowie hCG aufgestockt, allerdings mit einem anderen fetalen Kälberserumpräparat zu 5 % (v/v) (4,65 % ¹; PAA Laboratories GmbH). Für dieses Medium wurde der CO₂-Anteil im Brutschrank auf 10 % (v/v) angehoben, um einen pH-Wert von 7,3 zu gewährleisten.

Für Zellkulturen mit erhöhter Ammoniumkonzentration im Medium, z.B. durch erhöhten Aminostoffwechsel sowie durch Autolyse von Medienbestandteilen wie Glutamin, wird ein pH von 7,2 - 7,3 empfohlen. Das Ammonium steht mit dem zelltoxischen Ammoniak in einem pH-abhängigen Gleichgewicht. Der gewählte niedrige pH-Wert von 7,2 gewährleistet geringere Konzentrationen an Ammoniak als der übliche pH-Wert von 7,4 (REHM ET AL.1993).

¹ Das Kulturmedium ist vom Hersteller zu 500 ml portioniert. Durch die Zusätze der verschiedenen Lösungen an Antimykotikum, Antibiotika, Hormonen und fetalem Serum erhöhte sich das Volumen je Flaschenansatz auf 538 ml. Daher reduzierten sich die Konzentrationen aller Bestandteile des Mediums (siehe Anhang II) sowie der Zusätze durch Verdünnung um den Faktor 0,929. Die Quantifizierung der Mediumbestandteile und Supplemente in dieser Arbeit erfolgte auf der in der Zellkultur üblichen Weise und bezieht sich auf das Ursprungsvolumen der Mediumflasche.

Die Passage der adhärenenten Zellen erfolgte bei nahezu konfluentem Wachstum durch enzymatisches Ablösen (Trypsinieren), Suspendieren, Verdünnen und Aliquotieren in neue Kulturgefäße. Dazu wurde das Medium abgezogen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der Trypsinlösung (2,5 g/l in isotonischer NaCl - Lösung; 25-40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Kulturfläche) und Abziehen von ca. 90 % des Volumens nach 1 min wurden die trypsinbenetzten Zellen für weitere 4 min im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe der ursprünglichen Menge Kulturmediums wurde der enzymatische Verdau gestoppt und die Zellen konnten durch mechanisches Abschlagen vom Boden des Kulturgefäßes vollständig abgelöst werden. Nach homogener Suspendierung durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette wurden die Zellen aliquotiert. Es kamen Kulturgefäße unterschiedlicher Form und Größe zum Einsatz. Für die Massenzucht wurden T-Flaschen mit 75 cm^2 (Costar) und 80 cm^2 (Nalge-Nunc) mit jeweils 15 ml Kulturvolumen, für die Kultur kleinerer Zellmengen 25 cm^2 -T-Flaschen mit 5 ml Kulturvolumen (Costar) sowie für Miniaturansätze Multiwell-Platten mit je 2 ml Kulturmedium pro well (12-well-Nunclon, Nalge-Nunc) eingesetzt. Für die mikrophoto-graphische Dokumentation wurden die Zellen auf runden Deckgläschen kultiviert, die in die 12-Well-Platten einzusetzen waren. Für eine bessere Adhäsion der Zellen wurden die Kulturflächen teilweise mit Collagen beschichtet. Die Collagenlösung (Collagen Typ 1, rat-tail, 4,53 g/l, Sigma) wird 1:4 mit A. dest. verdünnt, jeweils 0,5 ml (12-well), 1 ml (25 cm^2 -T-Flasche) bzw. 2 ml (75 cm^2 und 80 cm^2 -T-Flasche) auf die Kulturfläche homogen aufgetragen und für 1 h bei 4-6 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenlösung abgezogen und die Gefäße 2 mal mit PBS gewaschen, um sie für die Kultur zu äquilibrieren. Bei den Kulturflaschen (Nunclon), die von Nalge-Nunc bezogen wurden, konnte auf eine Beschichtung für die Massenkultur verzichtet werden.

2.2 Charakterisierung der Lutealzellen

2.2.1 Bestimmung der Progesteronproduktion in vitro

Bestimmung der Progesteronkonzentration mittels Radioimmunoassay

Die Konzentrationen an Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion) in den Kulturmedium-Proben wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Diese Bestimmungen erfolgten im Labor der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Hoffmann an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Der RIA ist in der dortigen Arbeitsgruppe entwickelt worden (GERRES, 1991; HOFFMANN ET AL., 1973).

Zum Nachweis wurde ein aus Kaninchen gewonnenes Antiserum gegen BSA-gebundenes Progesteron eingesetzt. Als Tracerlösung wird ^3H -Progesteron (Aktivität 3,15 TBq/mmol (85 Ci/mmol); Konzentration 7,2 kBq/ml, Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Die Kreuzreaktivitäten für verwandte Steroide sind sehr gering (Tab. 2.1). Die untere Nachweisgrenze des RIA liegt bei 0,32 nM Progesteron (HOFFMANN ET AL., 1973).

Tab. 2.1: Kreuzreaktivitäten des Progesteron-RIA (nach Prof. Dr. B. Hoffmann, pers. Mitt.)

Steroid	relative Bindung
Pregnenolon	0,69 %
17 α -Hydroxy-Pregnenolon	0,49 %
Testosteron	0,37 %
17 α -Hydroxy-Progesteron	< 0,01 %
Androstendion	< 0,01 %
Dehydroepiandrosteron	< 0,01 %
Estradiol-17 β	< 0,01 %
Estron	< 0,01 %
Cortisol	< 0,01 %

Inhibition der Progesteronproduktion in vitro durch Prostaglandin F_{2 α}

Zur Untersuchung inhibitorischer Effekte des luteolytischen PGF_{2 α} wurde der analoge Wirkstoff Tiaprost (Iliren C, Hoechst Roussel Vet) eingesetzt. Das Präparat wird bei Wiederkäuern zur Brunststeuerung, zur Behandlung von Sub- und Anöstrie sowie Lutealzysten eingesetzt. Tiaprost ist gegenüber dem Prostaglandin F_{2 α} besser wasserlöslich und zeigt in Lösung eine bessere Stabilität. Seine biologische Wirksamkeit ist allerdings 10-fach niedriger (PETRAUSCH, 1997). Es wurde in Konzentrationen von 1 mg/l und 10 mg/l eingesetzt.

2.2.2 Mikroskopische Charakterisierung der Zellen

Mikroskopische Technik

Für die mikroskopische Untersuchung der Zellen in Kulturflaschen und Multiwell-Patten wurde ein inverses Mikroskop (Leitz-Diavert, Vergrößerung 100 - 320-fach), für histologische Untersuchungen der Zellen in Deckglaskammern ein Labormikroskop (Leitz-Dialux, Vergrößerung 100 - 1000-fach) verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen der Lutealzellen

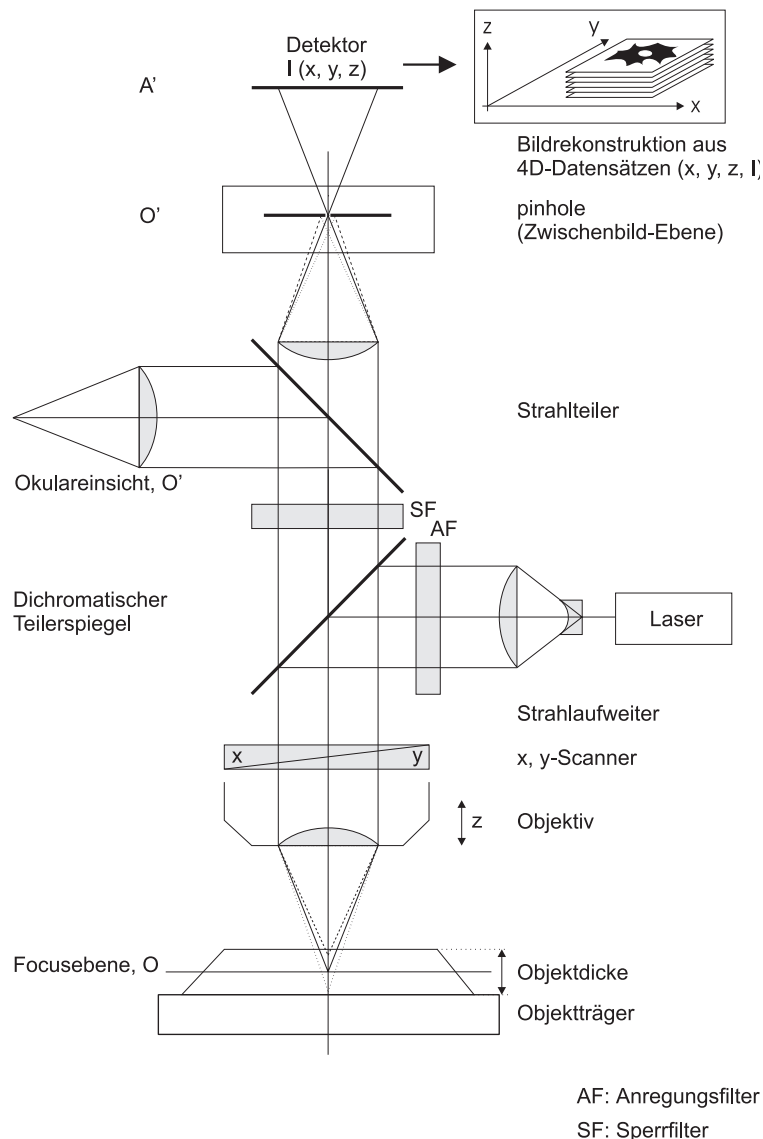


Abb. 2.1: Strahlengang und Bauteile eines konfokalen Laserscan-Mikroskops (schematisch):

Das monochromatische Anregungslicht des Lasers strahlt nach Aufweitung im Auffichtverfahren stark fokussiert auf das Objekt. Das Fluoreszenzlicht, welches vom Objekt zurückstrahlt, wird durch eine enge Meßblende in der Zwischenbildebene (Pinhole) hindurch über einen Photomultiplier aufgenommen. Der fokussierte Laserstrahl und das Pinhole werden in x, y-Richtung synchron über das Objekt geführt. Die Fluoreszenz wird in jeder Position sequenziell aufgenommen und kann über eine nachgeschaltete Bildverarbeitung jedem Punkt der gescannten Fläche zugeordnet werden. Darüber hinaus kann der Fokus des Laserstrahls und damit auch der Fluoreszenzemission in z-Richtung durch das Objekt geführt werden. Die Verarbeitung der x, y und z-Positionsdaten und ihrer Fluoreszenzintensität ermöglicht eine 3-dimensionale Rekonstruktion des Objekts. Bei eng geschlossenem Pinhole ergibt sich eine hohe Auflösung, bei offenem Pinhole ist eine Übersichtsdarstellung möglich.

wurden an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (Axiovert 135 M, Zeiss, optische Vergrößerung 400-fach; Argon-Ionen-Laser, Coherent Enterprises; Spektral-Filtereinheit MRC 1024, Bio-Rad, Bildverarbeitung, Bio-Rad) in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wolfgang Clauß, Institut für Tierphysiologie, Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 488$ nm. Die Fluoreszenz wurde oberhalb der Wellenlänge von $\lambda = 515$ nm (Kantenfilter OG-515) über Photomultiplier aufgenommen, digitalisiert und elektronisch verarbeitet. Für die Aufnahmen wurden Laserleistungen von 3 bis 30 % der maximalen Leistung, sowie Meßblenden (Pinholes) von 0,7 und 3,1 μm Durchmesser verwendet (Abb. 2.1). Der Verstärkungsfaktor für den Photomultiplier wurde einheitlich auf 1500 gesetzt. In der nachgeschalteten Bildverarbeitung wurde eine Kalman-Filterung vorgenommen, bei der aus zwei hintereinander aufgenommenen Einzelbildern für jedes Pixel eine Mittelwertbildung der Fluoreszenzintensität durchgeführt wird. Diese Filterung ist sinnvoll, da vor allen Dingen bei sehr kleinem Pinhole und starker Fokussierung die optische Auflösung (0,15 - 1 μm) im Bereich der Anregungswellenlänge des Lasers (488 nm) liegt. Es kann zu optischen Artefakten kommen, die durch Kalman-Filterung gemindert werden. Der dadurch bedingte Verlust an Kontrast ist zu vernachlässigen.

Die raster-elektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen wurden in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit (ZBB) am Strahlencentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen von Frau Dr. Ursula Richter angefertigt (REM Philips XL 20, 10 kV Beschleunigungsspannung, Vergrößerung 500 bis 1000-fach). Die Herstellung der mikroskopischen Präparate erfolgte am Institut für Veterinär-Pathologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eberhard Burkhardt.

Herstellung von Präparaten für die Lichtmikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung der Zellen erfolgte nach adhärenter Kultur für 7 Tage. Dazu wurden die auf runden Deckgläsern in 12-Well-Platten bis zur halben Konfluenz kultivierten Zellen 2 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Deckglas mit zwei schmalen Streifen doppelseitigem Klebeband mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger befestigt und in den Spalt der so entstandenen Deckglaskammer seitlich PBS eingespült. Die Oberseite des Deckglases wurde schließlich mit A. dest. von Salzresten gereinigt.

Herstellung von Präparaten für das REM

Proben von Lutealzellen auf Cytodex 3 Partikeln wurden zunächst mit Glutardialdehyd (10 % (v/v) in Cacodylatpuffer) im Volumenverhältnis 1:10 für 24 h fixiert und auf dünner Aluminiumfolie sedimentiert. Anschließend wurden sie einer Alkoholreihe entwässert (Isopropanol 50, 70, 90, 96 und 100 % (v/v)) und in drei Stufen in Amylacetat (Acetamylester) (Isopropanol : Acetamylester 3:1, 1:1 und 1:3 (v/v)) überführt. Diese Präparationen wurden mittels Kritischer-Punkt-Trocknung (Critical Point Drying Device, Polaron) in CO_2 -Atmosphäre von Lösungsmittel befreit und mit Gold bedampft (Schichtdicke ca. 60 μm) (Sputtering Device, Balzers Union Ltd.).

Mikroskopische Zellvermessung

Mit einem Meßobjektträger (Leitz-Meßobjektträger, 2 mm Scala, 0,01 mm Intervall) wurde ein Meßokular (Leitz-Meßokular 10 x, relative Skala) auf den Abbildungsmaßstab der gewählten Objektiv- und Okularkombination geeicht (Objektivvergrößerung 25 x, Okularvergrößerung 10 x). Auf runden Deckgläsern bis zur halben Konfluenz kultivierte Lutealzellen wurden 7 Tage nach Inkulturnahme auf ihren größten Zell- und Zellkerndurchmesser hin vermessen.

Abschätzung des konfluenten Wachstums

Für den Einsatz der adhärent wachsenden Lutealzellen in Kulturexperimenten hat es sich als praktisch erwiesen, eine Abschätzung des Konfluenzgrades im mikroskopischen Bild vorzunehmen und als Maß für die Zellmasse in einer Kulturflasche vorzunehmen. Waren die Zellen auf der gesamten Kulturfläche dicht an dicht gewachsen, so wurde die Kultur als konfluent bezeichnet. Waren die Zellen auf der Kulturfläche noch vereinzelt und ohne direkten gegenseitigen Zellkontakt zu finden, so wurde die Kultur als halbkonfluent eingestuft. Für die cytologischen Untersuchungen wurden durchweg halbkonfluente Kulturen eingesetzt, um einzelne Zellen im mikroskopischen Bild erkennen zu können. Bei der Massenzucht der Zellen für Kulturexperimente im Bioreaktor kamen dagegen ausschließlich konfluente Flaschenkulturen zum Einsatz.

Mikroskopische Zellzählung

Für die Bestimmung der Zelldichte in Suspension wurden Zählkammern aus der Hämatologie verwendet. Sie eignen sich zur Zählung von suspendierten Zellen und Partikeln. Die Bürker-Zählkammer verfügt über zwei Zählflächen mit jeweils 9 Großquadraten mit je 1 mm² Fläche. Bei einer Kammertiefe von 0,1 mm resultiert daraus ein Referenzvolumen von 0,1 mm³ je Zählung. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10.000 ergibt sich die Zelldichte in Zellen pro ml Suspension. Die Großquadrate sind zur übersichtlichen Zählung in 16 Kleinquadrate mit je 0,04 mm² Fläche unterteilt. Für die Zellzahlbestimmung werden Tropfen von wenigen µl der Probensuspension vorsichtig auf die Zählfläche gesetzt, das Deckglas seitlich aufgeschoben und jeweils beide Großquadrate ausgezählt. Diese Prozedur wird durch mehrfaches Auftragen frischer Suspension wiederholt und der arithmetische Mittelwert errechnet. Durch den relativ großen Umrechnungsfaktor ergibt sich eine maximale Auflösung der mikroskopischen Zellzählung von 10.000 Zellen/ml.

Zur Bestimmung der maximalen Zelldichte wurden konfluente Lutealzellkulturen aus 25 cm² (Costar) und 80 cm² T-Flaschen (Nalge-Nunc) nach enzymatischer Ablösung und Suspendierung in gleichem Volumen verwendet. Die ermittelten Zellzahlen werden auf die Kulturfläche und das Kulturvolumen bezogen und geben die maximale Zelldichte bei Konfluenz wieder.

Herstellung von mikroskopischen Dauerpräparaten

Zur Herstellung von cytologischen Fluoreszenz-Dauerpräparaten eignet sich die Einbettung in Moviol (Hoechst AG). Der Zusatz von Diazobicyclo-Oktan (DABCO) zum Einbettungsmedium stabilisiert die Fluoreszenz (LANGANGER ET. AL, 1983).

Für die Herstellung der Präparate wurden die auf runden Deckgläsern in 12-Well-Platten bis zur halben Konfluenz kultivierten Zellen 2 mal mit PBS gewaschen, durch kurzes Eintauchen in Paraformaldehyd (3% (v/v) in PBS) fixiert und in Dabco/Moviol (1mg/ml, Hoechst AG) zur Konservierung und Fluoreszenzstabilisierung eingebettet.

Cytochemischer Nachweis lipidhaltiger Vesikeln

Über eine Vitalfärbung mit Sudan-III-Farbstoff lassen sich lipidhaltige Vesikeln in adhärent wachsenden Zellen ohne Fixierung nachweisen (ROMEIS, 1989).

Dazu wurden halbkongruente, auf runden Deckgläsern in 12-Well-Platten kultivierte Zellen für 30 min in 5 ml alkoholischer Sudan-III-Lösung (2 g/l Sudan-III in Ethanol 70 % (v/v)) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und für die mikroskopische Betrachtung in einer Deckglaskammer vorbereitet. Sudan-III ist ein Gemisch aus Sudan-Rot, Sudan-Orange sowie Sudan-Gelb. Die einzelnen Farbstoffkomponenten lagern sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Lipid- bzw. Wasserlöslichkeit in subzelluläre Strukturen wie lipoidhaltige Vesikeln ein. Sie ergeben im mikroskopischen Bild charakteristische Farbtöne.

Enzymcytochemischer Nachweis der Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Die Steroidgenese läßt sich über die Aktivitätsbestimmung einzelner Schlüsselenzyme intrazellulär über den Umsatz künstlicher chromogener Substrate nachweisen (GREGORAS-ZCZUK AND WOJTUSIAK, 1981; FISHER AND KAHN, 1972; PEARSE, 1972).

Die Reaktionslösung enthielt neben dem chromogenen Substrat Nitroblue-Tetrazolium (NBT; 0,5 g/l) und dem Cosubstrat NAD (2 g/l) einen Überschuß der Steroidvorstufe Dehydroepiandrosteron (DHEA) gelöst in PBS als weiteres Substrat. DHEA und NBT sind in wässrigen Lösungen schwer löslich und müssen daher zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsvermittler gelöst werden. Dazu wurden 1,75 mg DHEA und 2,5 mg NBT jeweils in 500 μ l DMSO gelöst und in 3,5 ml PBS vereinigt und schließlich 10 mg NAD zugesetzt. Bis zur halben Konfluenz auf runden Deckgläsern in 12-Well-Platten kultivierte Zellen wurden 2 mal mit PBS gewaschen und in 5 ml Reaktionslösung für 1 h in einer feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und für die mikroskopische Betrachtung in eine Deckglaskammer montiert. Durch den spezifischen Umsatz des DHEA wird NBT reduziert und es entsteht ein blau-schwarzer amorpher Niederschlag.

Fluoreszenz-Affinitätsmarkierung zum Nachweis des Gonadotropin-Rezeptors

Für die Affinitätsmarkierung von ovariellen Zellen wird das Proteohormon hCG mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) kovalent gekoppelt. Das hCG-FITC-Konjugat wurde über Zentrifugationsfiltration aufgereinigt und mittels Gelelektrophorese und Fluoreszenzdetektion überprüft. Mit dem aufgereinigten Konjugat wurden adhärenz- oder suspendierte, für 3-7 Tage hCG-frei kultivierte Zellen inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Kopplung und Aufreinigung

Die Kopplung von FITC an freie Aminogruppen von Proteinen erfolgt direkt, ohne zusätzliches Kopplungsreagens in alkalischem Milieu (HAUGHLAND, 1996).

Es wurden 558 µg hCG (1500 IU) in 500 µl Reaktionspuffer (NaHCO₃, 100 mM; pH 8,3) gelöst (Massenverhältnis Protein : FITC = 10 : 1). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von FITC in wässrigen Lösungen wird zunächst 1 mg FITC in 2 ml DMSO als Lösungsvermittler gelöst und 100 µl davon vorsichtig und unter Schütteln zu 500 µl des hCG-haltigen Reaktionspuffers gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert und die Reaktion schließlich durch Zentrifugationsfiltration (Zentrifugationsfilterhülsen, 2 ml, cutoff 3 kDa, Pall Gelman) in einer Tischzentrifuge (30.000 U/min, 15 min, 4 °C, Heraeus) durch Abtrennung des freien FITC gestoppt. Durch Suspension des Rückstands auf dem Filter mit PBS und mehrfaches Wiederholen der Zentrifugation wird freies FITC quantitativ entfernt.

Proteinbestimmung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration für die nachfolgende Gelelektrophorese wurde eine Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Zum quantitativen Nachweis von Proteinen in Lösung dient die Fähigkeit des Farbstoffs Coomassie-Blau, mit Proteinen über Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste farbige Komplexe zu bilden. Die entstehenden Farbtöne sowie die Farbintensität sind von der Proteinkonzentration abhängig und lassen sich photometrisch bestimmen (Bradford-Protein Assay, Bio-Rad).

Da das gekoppelte FITC den Proteinnachweis stört, wurde ein Aliquot des hCG-Präparats unmittelbar vor der Kopplung bereitgestellt und stellvertretend gemessen. Der Test wurde in einer Mikrotiterplatte (96-Well, Nunc) durchgeführt. Das Coomassie-Reagenz (Coomassie brilliant blue G-250, Bio-Rad) wurde in einer Verdünnung von 1 : 5 eingesetzt. Die Proben wurden in einem Volumen von 10 µl auf der Platte vorgelegt, mit jeweils 190 µl Coomassie-Reagenz vermischt und sofort bei einer Wellenlänge von 620 nm in einem Plattenphotometer (iEMS Reader MT, Labsystems GmbH) gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen gegen eine Proteinstandardreihe (Lab-Tol, Bio-Rad) durchgeführt. Die untere Nachweisgrenze dieser Proteinbestimmung lag bei 0,73 g/l Protein.

Kontrolle des Konjugates mittels Gelelektrophorese und Fluoreszenzkontrolle

Für die Auftrennung der Proteine wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese im Polyacrylamidgel in reduzierendem Milieu (β -Mercaptoethanol) mit Dodecylsulfat-Denaturierung (SDS) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt (Disk-SDS-PAGE). 15 μ l der Proteinproben (20 μ g Protein) wurden mit 5 μ l Probenpuffer (Roth) versetzt und für 1 min im Wasserbad auf 100 °C erhitzt. Für die Auftrennung wurde ein 13 %- und ein 14 %-Trenngel eingesetzt. Diese Gele wurden jeweils mit einem 5 %-Sammelgel kombiniert (vgl. Anhang II) (Elektrophoresekammer, Biorad). Als Molekulargewichtsstandards kamen jeweils 7 μ l farbiger Rainbow-Marker (RBM-low, Amersham Life Science) und LMW-Marker (Amersham Life Science) zum Einsatz. Die Proben wurden auf dem Gel für 30 min bei einer Spannung von 80 V fokussiert und anschließend für weitere 60 min bei 130 V aufgetrennt (LKB 200/400, Pharmacia).

Die Gele wurden nach Beendigung des Laufs kurz mit A. dest. gespült, dann für 20 min in Trichloressigsäure (20 % (v/v), TCA) und 15 min in Essigsäure (7,5 % (v/v)) inkubiert und daraufhin 2 h in A. dest. gewässert. Zur Fluoreszenzuntersuchung wurden die Gele anschließend für 45 min in TRIS-HCl-Puffer (pH 9,5) äquilibriert und die Fluoreszenz auf einem UV-Schirm bei 295 nm Wellenlänge photographisch dokumentiert (ISO 3000, Polaroid 667). Für die nachfolgende Coomassie-Färbung der Proteine wurden die Gele erneut in A. dest. gewässert und wieder in Essigsäure (7,5 % (v/v)) inkubiert. Nach 30 min in Coomassie-Färbelösung (Coomassie-blue 0,1 % (v/v)) wurden sie in Coomassie-Entfärbelösung (Methanol-Essigsäure) entfärbt und die verbleibenden blaugefärbten Banden unter Tageslicht wiederum photographisch dokumentiert (Polaroid 667, ISO 3000, Polaroid).

Aufreinigung von Lutealzellen durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Für die Auftrennung von Zellen aufgrund unterschiedlicher Dichte eignet sich die isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation (MAGOFFIN AND ERICKSON, 1988; COOPER, 1981; MCNAMARA ET. AL., 1980). Zur Herstellung des Gradienten wird Percoll verwendet. Dabei handelt es sich um kolloidale Kieselsäure-Partikeln, die mit Polyvinylpyrrolidon beschichtet sind (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1995).

Zunächst wurde durch Ultrazentrifugation in der üblichen Weise ein Percoll-Gradient erzeugt. In einem zweiten Schritt wurden nach Überschichten mit Probensuspension die Zellen in einer niedertourigen Zentrifugation nach unterschiedlicher Dichte im Gradienten aufgetrennt.

In situ Herstellung des Gradienten

Die Percoll-Stammlösung wurde auf den iso-osmotischen Wert des Zellkulturmediums äquilibriert. Dazu wurde 18 ml Percoll-Lösung mit 2 ml NaCl-Lösung (1,5 M) versetzt. Aus dieser Percoll-Lösung wurde dann durch Verdünnung mit NaCl-Lösung (150 mM) eine isotonische Gebrauchslösung erzeugt, deren Dichte dem Mittelwert des gewünschten Gradienten entspricht. Für einen Gradienten mit dem Dichtebereich von $\rho = 1,010 - 1,184 \text{ g/cm}^3$

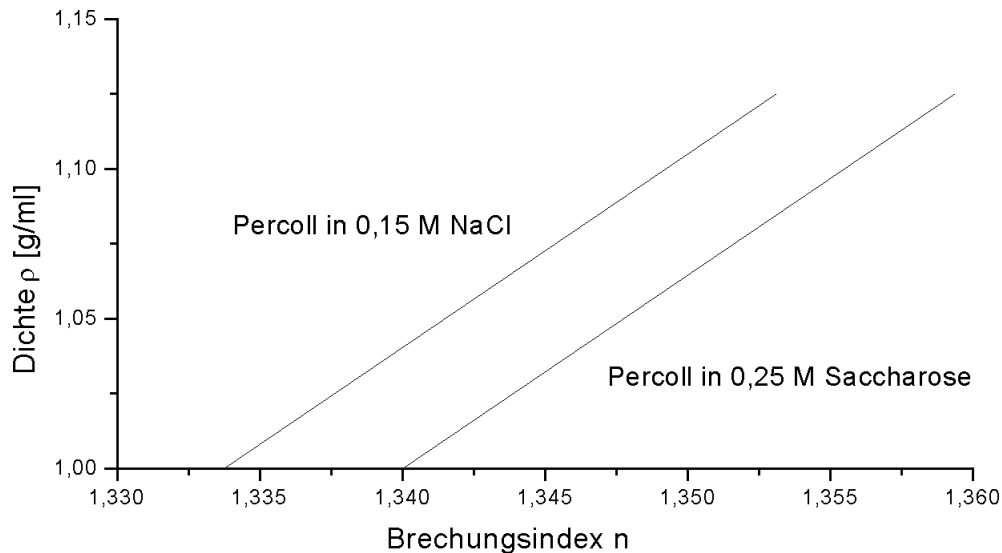


Abb. 2.2: Diagramm zur Bestimmung der Dichte einer Percoll-Lösung anhand des Brechungsindex.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Brechungsindex und der Dichte (nach PHARMACIA AMERSHAM BIOTECH, 1995)

erhält man so durch Verdünnung aus 45 Teilen Gebrauchslösung und 55 Teilen NaCl-Lösung (150 mM) eine Dichte von 1,055 g/cm³. Der Gradient wurde in einer Ultrazentrifuge (Optima L-70, Festwinkelrotor 70 Ti, Beckman Coulter, 30.000 g, 45 min, 4 °C) in Portionen zu 20 ml in situ erzeugt. Die Fraktionierung erfolgte durch verwirbelungsfreies Absaugen mit einer peristaltischen Pumpe vom Boden des Zentrifugenröhrchens mit Hilfe einer plangeschliffenen Edelstahlkanüle zu Aliquots von 1,5 ml. Die Kontrolle des Gradientenverlaufs erfolgte durch Messung der Brechungsindizes der gewonnenen Fraktionen mit einem Refraktometer (Leitz). Über ein Diagramm kann den ermittelten Brechzahlen eine Dichte zugeordnet werden (Abb. 2.2). Zur Überprüfung der Gradienten zur Zellseparation wurde jeweils ein paralleler Ansatz refraktometrisch vermessen und verworfen.

Analytische Dichtegradientenzentrifugation

Für die analytische Dichtegradientenzentrifugation wurde eine Primärsuspension aus der Gewebepreparation (a) sowie Zellsuspension aus der Primärkultur (b) verwendet.

(a) Der Gradient wurde verwirbelungsfrei mit 5 ml der Primärsuspension überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge bei niedriger Beschleunigung (400 g, Festwinkelrotor, 45 min, 4 °C).

(b) Konfluent gewachsene Lutealzellen einer 80 cm² T-Flasche (Nunc) wurden für 3-7 Tage hCG-frei kultiviert, dann abtrypsinisiert und die Suspension durch Zentrifugation (Tischzentrifuge Hettich, 2000 U/min, 5 min, 8 °C) aufkonzentriert. Das lockere Pellet wurde mit 1 ml des Fluoreszenzmarkers hCG-FITC versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert, schließlich in 8 ml D-MEM suspendiert und vorsichtig auf den in situ erzeugten Gradienten aufgetragen.

Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge bei niedriger Beschleunigung (400 g, Festwinkelrotor, 45 min, 4 °C). Unter UV-Anregung ($\lambda = 365$ nm) können die entstandenen Banden über die FITC-Fluoreszenz untersucht werden.

Die anschließende Fraktionierung erfolgte auch hier durch verwirbelungsfreies Absaugen mit einer peristaltischen Pumpe von Boden des Zentrifugenröhrchens mit Hilfe einer plangeschliffenen Edelstahlkanüle zu Aliquots von 1,5 ml. Die Aliquots wurden ebenfalls unter UV-Anregung auf ihre FITC-Fluoreszenz untersucht und zusätzlich mikroskopisch kontrolliert.

2.2.3 Kryokonservierung primärer Lutealzellen

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte in einem speziellen Einfriermedium mit einem hohen Gehalt an fetalem Kälberserum und dem Zusatz DMSO. Die Serumproteine stabilisieren das osmotische Milieu beim Einfrier- und Abtauvorgang, das DMSO hingegen verhindert eine Eiskristallbildung und damit die Beschädigung der chromosomalen DNA.

Für die Kryokonservierung wurden Zellen von 5 konfluent bewachsenen T-Flaschen (80 cm²) eingesetzt. Die Lutealzellen werden vollständig abgenommen, vereinigt und durch Zentrifugation (Tischzentrifuge Hettich, 2000 U/min, 5 min, 4 °C) sedimentiert. Das Zellpellet wird in 5 ml Kulturmedium suspendiert, anschließend vorsichtig und unter Schwenken 5 ml Einfriermedium (2,75 ml D-MEM, 1,25 ml FKS; 1 ml DMSO) zugegeben und die Gefriersuspension in Kryogefäße (2 ml, Nalgene) zu 1,8 ml aliquotiert. Die Proben wurden sofort bei -70 °C tiefgefroren und konnten für mehrere Monate erfolgreich gelagert werden.

2.2.4 Anzucht primärer Lutealzellen aus kryokonservierten Proben

Für die Anzucht kryokonservierter Zellen wurden Gefrierproben (1,8 ml Gefriersuspension in 2 ml Kryogefäße) zügig bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in 20 ml Kulturmedium suspendiert, um das DMSO als Zellgift zunächst zu verdünnen. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge Hettich, 2000 U/min, 5 min, 4 °C) und der DMSO-haltige Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in Kulturmedium resuspendiert und in eine 80 cm² T-Flasche (Nunc) ausgesät. Aus fünf T-Flaschen, die zur Kryokonservierung vorbereitet worden waren, erhielt man eine T-Flasche zur Anzucht.

2.3 Bioreaktorentwicklung zur kontinuierlichen Langzeitkultur adhärenter Zellen im Labormaßstab

2.3.1 Bioreaktortechnik

Für die kontinuierliche Kultur der Lutealzellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Bioreaktor mit verschiedenen Kulturmodulen entwickelt und betrieben. Die Entwicklungsarbeit umfaßte die Konzeption des Kultursystems entsprechend den Erfordernissen der adhärent wachsenden Lutealzellen und die technische Umsetzung in Zusammenarbeit mit der feinmechanischen Werkstatt des Instituts. Darüber hinaus wurden die Elektroden des Bioreaktors über eine Meßkarte an einen PC angeschlossen und die benötigte PC-gestützte Prozeßkontrolle mit Datenerfassung und Regelungen programmiert.

2.3.2 Bioreaktorumgebung

Der Bioreaktor ist modular aufgebaut und kann, je nach Fragestellung und Erfordernissen der zu kultivierenden Zellen, mit einem Hohlfaserm- oder einem Wirbelschichtmodul betrieben werden. Er ist thermostatisiert und verfügt über ein Gasversorgungssystem, welches bedarfsgerecht O_2 und CO_2 , entsprechend den von der Prozeßkontrolle gelieferten Stellwerten, in das Reaktormodul einbringt (Abb. 2.3, 2.5, 2.6).

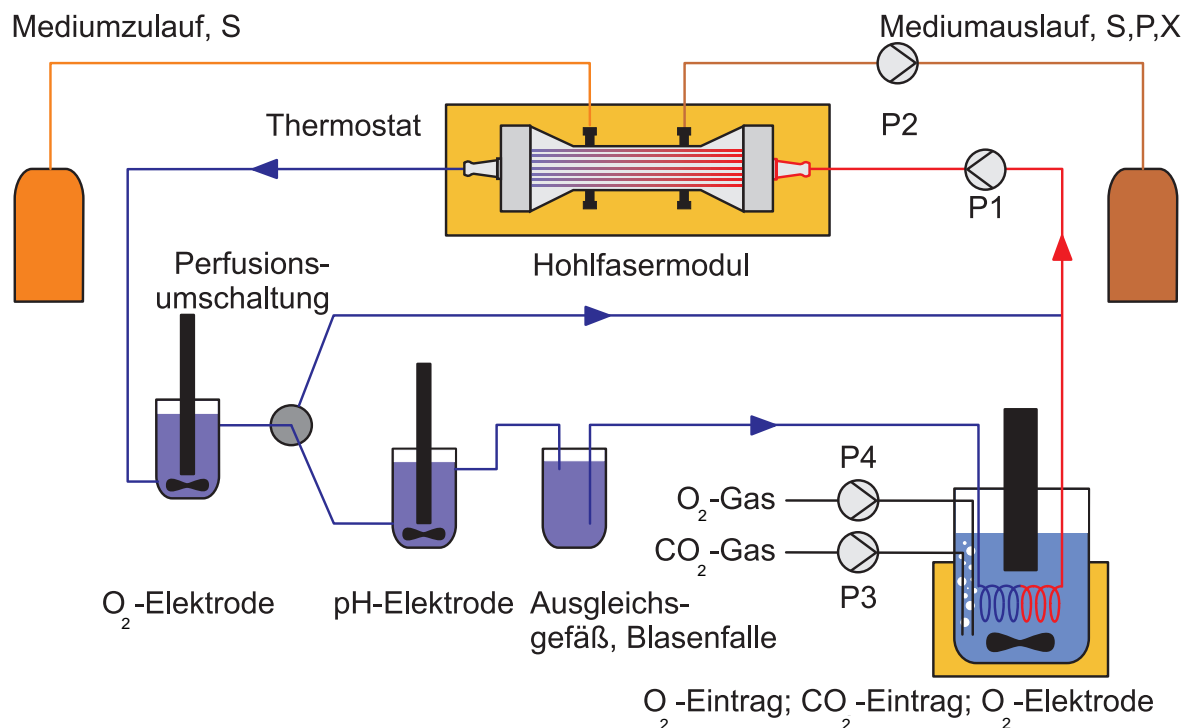


Abb. 2.3: Fließdiagramm des Bioreaktors mit Hohlfaserm-Modul

Über die axialen Ports des Kulturmoduls strömt ein Perfusionsmedium, das im Begasungsgefäß regeneriert wird. Über die lateralen Ports kann das extrakapilläre Volumen kontinuierlich ausgetauscht werden. In den Kreislauf des Perfusionsmediums sind in Meßzellen Elektroden für pH-Wert und O_2 -Konzentration integriert. Das Hohlfaserm-Modul ist thermostatisiert.

Die Prozeßkontrolle wird von einem PC und einem Datenerfassungs- und Regelungsprogramm übernommen (Abb. 2.10, 2.11). Das System ist komplett autoklavierbar und auf einem Aluminiumgestell vormontiert, so daß es in kompakter Form in den Autoklaven eingebracht und unter der Sterilbank für den Betrieb vorbereitet werden kann.

Das verwendete Schlauchsystem zur Gasversorgung und Mediumperfusion ist aus dickwandigen Silikonschläuchen (Innendurchmesser 3 mm, Wanddicke 2 mm, IDL-Silikon) und heißdampfbeständigen Verbindungstücken (PP, Teflon; Fischer, Roth, Bohlender) gebaut. Dieses zeichnet sich aufgrund sehr geringer Wasser- und Gasdiffusion über die Wandungen der Schläuche durch einen vernachlässigbaren Verlust an Flüssigkeit und Gasen aus. Für den kontinuierlichen Betrieb ist ein Schlauchsystem zur Mediumzufuhr und zur Mediumentsorgung vorgesehen. Die Vorratsflasche kann während des Reaktorbetriebs unter der Sterilbank problemlos ausgetauscht werden und wird in einem eisgekühlten Thermobehälter gelagert. Das Abfallgefäß wurde so dimensioniert, daß es das gesamte abgeführte Flüssigkeitsvolumen aufnehmen kann und nicht ausgetauscht werden muß. Zum Autoklavieren wurde der Bioreaktor im Gestell zusätzlich in einen Autoklavierbeutel verpackt, der erst unmittelbar vor Inbetriebnahme nach einer Sichtprüfung entfernt wurde.

2.3.3 Hohlfasermodul

Bei den verwendeten Hohlfasermodulen (Cell-Pharm BR-110) handelt es sich um Module zur konventionellen Kultur von Hybridomazellen. Die Module tragen ein Bündel von 3.150 porösen Hohlfasern aus Cellulose (Innendurchmesser 210 µm, Wanddicke 25 µm, cutoff 10 kDa) mit einer Gesamtoberfläche von 1.400 cm² und einem extrakapillären Kulturvolumen von 12 ml. Das Gehäuse ist aus Polycarbonat gefertigt und verfügt über Anschluß-ports für den Zugriff auf das extra- sowie intrakapilläre Volumen (Abb. 2.6). Die Zellen werden im extrakapillären Volumen auf der Außenseite der porösen Hohlfasern kultiviert (Abb. 2.4).

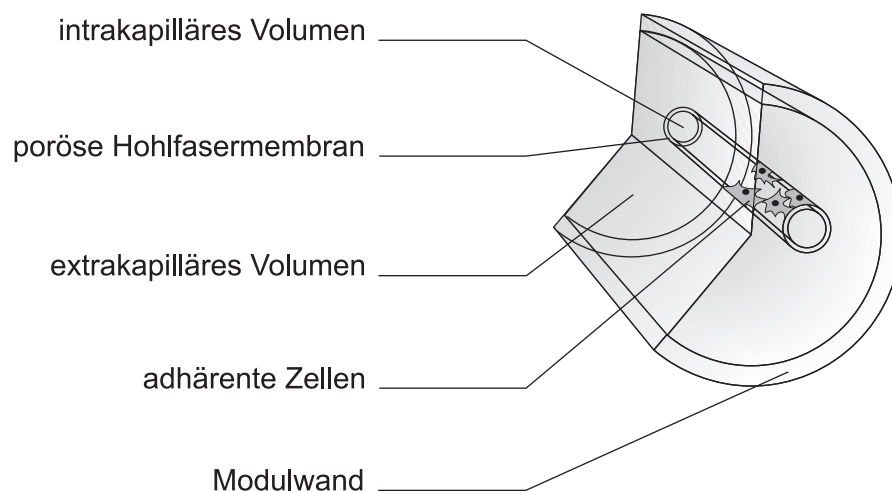


Abb. 2.4: Hohlfasermodul im Anschnitt, schematisch

Die kontinuierliche Perfusion erfolgt über die axialen Ports und das intrakapilläre Volumen, der Austausch des Kulturmediums über die lateralen Ports zum extrakapillären Volumen. Die Sauerstoffversorgung der Zellen im extrakapillären Volumen ist durch Diffusion von Medium über die porösen Hohlfasern gewährleistet. Aufgrund der Durchgängigkeit der

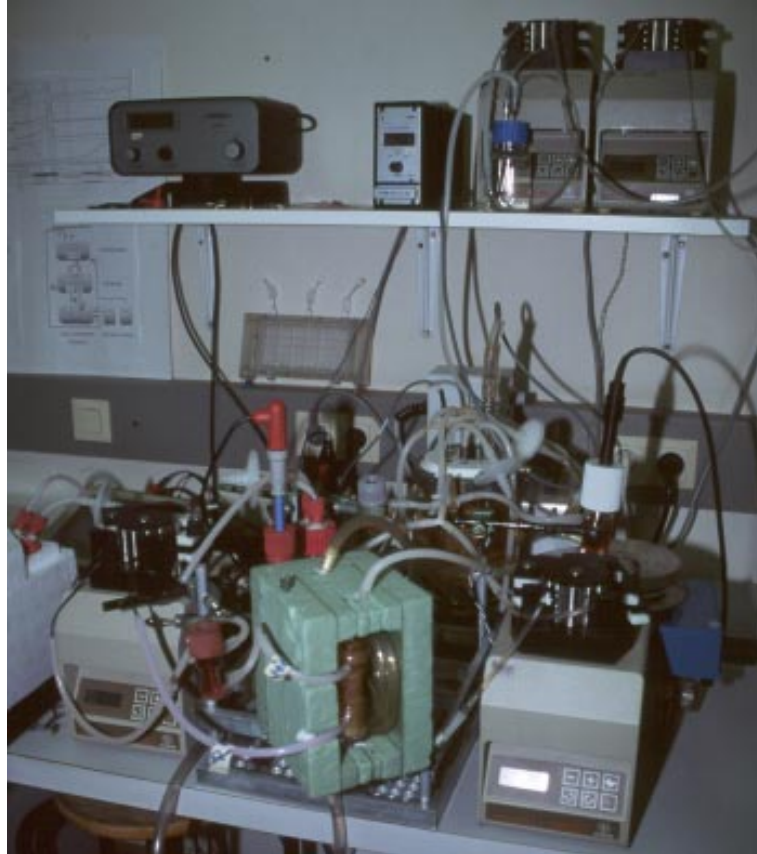


Abb. 2.5: Hohlfaser-Bioreaktor in der Übersicht mit Versorgungs- und Meßsystemen



Abb. 2.6: Hohlfasermodule im Thermostaten

porösen Fasern für die in dieser Arbeit relevanten Metabolite setzt sich das Gesamtvolumen der Kultur (KV) aus dem extrakapillären Volumen und dem Volumen des Perfusionskreislaufs zusammen. Die Sauerstoffmessung erfolgt in einer Durchflußmeßzelle unmittelbar am Ausgang des Reaktormoduls und im Vorlaufvolumen des Begasungsgefäßes (Abb. 2.3, 2.5). Die große Austauschoberfläche sowie die im Verhältnis zum extrakapillären Volumen hohe Perfusionsrate von 7 ml/min erlaubt die Extrapolation auf die O₂-Konzentration im Zellraum. Das Perfusionsmedium wird in einem Begasungsgefäß regeneriert. Dort wird im Vorlaufvolumen eine konstante O₂-Konzentration vorgelegt. Das Perfusionsmedium wird über einen dünnwandigen Silikonschlauch (Länge 2 x 2 m parallel, Wanddicke 0,2 mm) durch das Vorlaufvolumen geführt. Über Diffusion durch die Wandung des Silikonschlauchs ist ein Ausgleich des pH-Wertes und der O₂-Konzentration gemäß dem Gradienten gewährleistet. Das Reaktormodul befindet sich in einem Thermobehälter, der über eine Wärmeaustauscherschleife mit einem Thermostaten verbunden ist und über einen Sensor zur Temperaturkontrolle (PT 100 an pH-Meter Mettler-Delta 350) verfügt. Die Temperatur wurde im Reaktorbetrieb manuell kontrolliert. Sie wurde für alle durchgeführten Reaktorläufe auf 36,5 °C eingestellt. Über Stichproben konnte eine Schwankungsbreite von 36,1 bis 36,9 °C festgestellt werden.

Zur Inbetriebnahme nach dem Autoklavieren wurde das Ausgleichsgefäß und die Blasenfalle mit 80 ml Medium steril befüllt und der Perfusionskreislauf gestartet. Nach einem Vorlauf von 24 Stunden hatten sich stabile Kultivierungsbedingungen eingestellt und die vorbereitete Zellsuspension konnte eingespült werden. Das Hohlfasermodul wurde nun vorsichtig mehrfach über Kopf geschüttelt, um die Zellen gleichmäßig im Kulturraum zu verteilen. Diese Prozedur wurde nach jeweils 4 Stunden zweimal wiederholt. Zunächst wurde der Reaktor für mindestens 48 Stunden im batch-Betrieb gefahren, um die Ausspülung noch nicht anhaftender Zellen zu vermeiden. Anschließend wurde das extrakapilläre Volumen mit frischem Medium durchgespült und dann der Reaktor im kontinuierlichen Betrieb mit konstanter Verdünnungsrate betrieben. Eine direkte Probennahme im Modul ist nicht möglich. Da sich der Port zur sterilen Beprobung hinter dem Auslauf des Kulturraums befindet, ist eine gewisse Verzögerung durch den Transport aus dem Kulturvolumen in die Probennahmestelle zu berücksichtigen.

2.3.4 Wirbelschichtmodul

Das Wirbelschichtmodul ist ein Suspensionskultursystem mit konstanter Gasblasensäule und intermittierender Magnetrührung. Die aufsteigende Blasensäule (airlift) gewährleistet in Kombination mit der Rührung eine turbulente Durchmischung des Kulturvolumens mit geringer mechanischer Belastung der Zellen. Die sphärischen Microcarrier (Dextran-Gel, Cytodex 3,

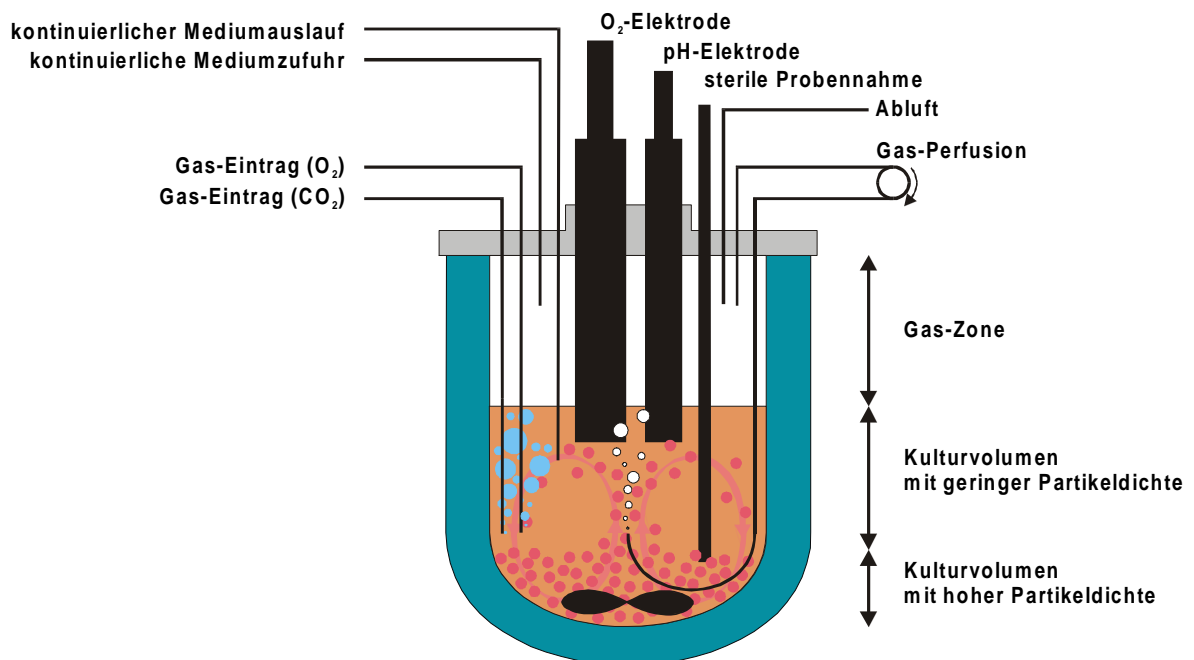


Abb. 2.7: Wirbelschichtmodul mit Versorgungssystemen und Meßelektroden (schematisch)
Die Gasblasensäule in Kombination mit intermittierender Rührung gewährleistet eine Suspendierung der Gelpartikeln. Es resultieren Zonen mit unterschiedlichen Partikeldichten.

Collagen-beschichtet, 60 µg/cm², Amersham Pharmacia Biotech) mit den adhären wachsenden Zellen werden in Suspension gehalten und darüber hinaus im Kulturmedium homogene Substrat- und Produktkonzentrationen sichergestellt.

Das Kulturgefäß basiert auf einem doppelwandigen HWS-Reaktionsgefäß aus Glas mit 100 ml Innenvolumen. Über den Wärmemantel kann das Gefäß kontinuierlich mit Warmwasser aus dem externen Thermostaten (Haake D 1) über Schlauchverbindungen durchspült werden. Das Reaktionsgefäß wird durch einen im Hause angefertigten Deckel aus Teflon abgeschlossen, in welchen alle Durchführungen für Elektroden und sämtliche Zu- und Abflüsse eingefügt sind (Abb. 2.7, 2.8, 2.9). Neben den mit O-Ringen abgedichteten Anschlüssen der O₂-Elektrode (Typ 322, Mettler-Toledo GmbH Prozeßanalytik) und der pH-Elektrode mit Temperaturmessung (InPro 3100 mit PT 1000, Mettler-Toledo GmbH Prozeßanalytik) sind weitere 7 Durchführungen mit Edelstahlkanülen (Außendurchmesser 2 mm, Unimed SA) unterschiedlicher Länge und Form mit Luerlock-Anschlüssen für Versorgungs-

schläuche integriert. Über diese Anschlüsse kann die Zufuhr der Gase, die kontinuierliche Zufuhr und Ausfuhr des Mediums, eine sterile Probennahme sowie die Abluft und der Druckausgleich über Sterilfilter (Midisart 2000, cutoff 0,2 µm, Sartorius AG) gewährleistet werden.



Abb. 2.8: Wirbelschichtmodul mit doppelwandigem Kulturgefäß und Teflondeckel mit Durchführungen für Versorgungssysteme und Elektroden

Die intermittierende Rührung wird mit einem Magnetrührsystem (Ikamag-Reo, Drehzahl 30 U/min) ohne Wellendurchführung mit Zeitschaltung (Kleinfeld Labortechnik GmbH & Co) erzeugt. Der teflunummantelte Rührmagnet ist mit einem zentralen Abstandsring versehen, um die mechanische Belastung der Zellen und Partikeln am Gefäßboden bei Rührung zu verringern. Über eine peristaltische Pumpe (Minipuls 2, Abimed Analysen-Technik GmbH) mit angeschlossenem Schlauchsystem (Versorgungsschläuche aus Silikon, Pumpenschläuche aus PVC) wird Gas mit geringem, konstantem Volumenstrom (10 ml/min) aus dem flüssigkeitsfreien Reaktorkopf abgesaugt und über eine gebogene Langkanüle zentral am Boden des Reaktorgefäßes eingebracht. O₂ und CO₂ (Technische Druckgase, Vordruck 1,5 bar, Messer Griesheim GmbH) werden über unabhängige Kanäle mit peristaltischen Pumpen über Sterilfilter in diesen Gasperfusionskreislauf dosiert. Über zwei weitere peristaltische Pumpen wird im kontinuierlichen Betrieb frisches Medium zugeführt und eine entsprechende Menge des Kulturmediums entnommen. Damit lassen sich gezielt konstante Verdünnungsraten einstellen. Über eine Langkanüle können mit einer sterilen Spritze durch eine Silikon-Durchstechmembran sterile Proben des Kulturmediums gezogen werden. Zwei



Abb. 2.9: Wirbelschicht-Bioreaktor in der Übersicht mit Versorgungs- und Meßsystemen

Sterilfilter für die Abluft gewährleisten den Druckausgleich mit der Umgebungsatmosphäre. Der Reaktor ist mit den Meßelektroden, allen Anbauteilen sowie den angeschlossenen Schlauchsystemen heißdampfsterilisierbar. Alle Oberflächen im Reaktorsystem werden vor dem Autoklavieren silanisiert um eine Adhäsion von Partikeln und Zellen zu verhindern. Dazu werden die betreffenden Oberflächen mit Silikonöl (Carl Roth GmbH & Co) benetzt und für 1 h bei 100 °C im Wärmeschrank (Heraeus) getrocknet.

Zur Inbetriebnahme nach dem Autoklavieren wurde das Wirbelschichtmodul über den Zulauf mit 20 ml Medium steril befüllt und die Gasperfusion und intermittierende Rührung gestartet. Nach einem Vorlauf von 24 Stunden hatten sich stabile Kultivierungsbedingungen eingestellt und die vorbereitete Zellsuspension konnte eingespült werden.

Anzucht der Lutealzellen auf Cytodex 3 Microcarriern

Adhärent wachsende Zellen lassen sich auf Microcarriern anzüchten und kultivieren. Für langsam wachsende Primärkulturzellen wird ein Verhältnis von Zellen zu Partikeln von 15 : 1 bis 10 : 1 empfohlen (Amersham Pharmacia Biotech, Microcarrier cell culture: principles and methods). Zur Inokulation der Lutealzellen auf den Microcarriern für die Kultur im Wirbelschichtmodul wurden 8 - 10 mit Zellen konfluent bewachsene T-Flaschen (80 cm², Nunc) und 100 mg Cytodex 3 Partikeln (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Dies entsprach 8×10^7 bis 1×10^8 Zellen sowie 4×10^6 Partikeln pro Ansatz. Zunächst wurden die Partikeln in PBS für 24 h bei 4 - 6 °C gequollen, mehrfach durch Dekantieren des Überstands nach Sedimentation und erneutem Resuspendieren in frischem Puffer gewaschen. Die Partikeln

ließen sich in Suspension autoklavieren und anschließend in sterilem Kulturmedium äquilibrieren. Die Lutealzellen wurden abtrysiniert, durch Zentrifugation (Tischzentrifuge Hettich, 2000 U/min, 5 min, 4 °C) sedimentiert und in 40 ml Gesamtvolumen suspendiert. Im Brutschrank wurde die Zellsuspension für 24 h unter Intervallrührung mit der Partikelsuspension inokuliert (10 min Rührung bei 30 U/min und 240 min Ruhe).

Die Oberflächen der verwendeten Gefäße, die mit den Partikeln in Kontakt kommen, sind vor dem Autoklavieren silanisiert worden. Nach Inokulation wurde die Partikelsuspension mit den adhärenen Lutealzellen in den vorbereiteten Reaktor eingespült und das Zuleitungssystem abschließend mit 30 ml Kulturmedium nachgespült, um zurückbleibende Partikeln in den Kulturraum zu befördern und das gewünschte Kulturvolumen von 90 ml zu erreichen.

Probennahme im Wirbelschichtmodul

Im batch-Betrieb kann direkt über den Probennahmeport im Reaktorgefäß eine Probe aus dem Kulturvolumen steril entnommen werden. Diese Probe gibt den Zustand zum Zeitpunkt der Probennahme wieder, ist aber vom Volumen auf 1 - 2 ml begrenzt, damit das Kulturvolumen nicht zu sehr verringert wird. Im kontinuierlichen Betrieb dagegen besteht die Möglichkeit, über einen weiteren Probennahmeport im Ablaufsystem des Reaktors eine Probe zu nehmen, ohne dadurch das eigentliche Kulturvolumen zu beeinflussen. Je nach Volumenstrom im Abfluß ist allerdings eine zeitliche Verzögerung für den Transport aus dem Kulturvolumen in die Durchflußzelle zur Probennahme zu berücksichtigen.

Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Eppendorfgeläße gefüllt und bei -20 °C tiefgefroren. Die Bestimmung des Gehalts an Progesteron sowie der anderen biochemischen Parameter erfolgte nach Abschluß des jeweiligen Kulturexperiments.

2.3.5 Meßanordnung

Für die Prozeßkontrolle des Kulturmoduls wird die Konzentration an gelöstem O₂ und der pH-Wert des Kulturmediums über einen PC (486 DX, 8 MB RAM, Peacock) mit Meßkarte (ME-300 ISA-Multi-I/O, Meilhaus Elektronik GmbH) erfaßt und über getrennte Regelkreise auf definiertem Niveau konstant gehalten. Die O₂-Elektrode liefert über den Meßumformer ein analoges, der Konzentration linear proportionales Spannungssignal von 0 - 10 V, das vom A/D-Wandler der Meßkarte digitalisiert wird. Das pH-Meßgerät liefert direkt ein digitales Signal von pH-Wert und Temperatur an der Elektrode, welches über die serielle Schnittstelle des PC eingelesen wird (unidirektional, zeitgesteuert alle 2 s).

Die parallele Messung der O₂-Konzentration und des pH-Wertes im Kulturmedium birgt ein meßtechnisches Problem. So kann es zu einem Kurzschlußstrom kommen, wenn die amperometrische O₂-Elektrode und die hochohmige potentiometrische pH-Elektrode im gleichen Elektrolyten über die nachgeschaltete Datenerfassung miteinander elektrisch gekoppelt sind. Dieser Störstrom wird bei der hier eingerichteten Meßanordnung vermieden, da die Meßkarte im PC über eine galvanische Entkopplung am A/D-Wandler verfügt, also

das pH-Meßgerät am seriellen Port und das O₂-Meßgerät am A/D-Wandler voneinander elektrisch getrennt sind. Somit ist eine sichere simultane O₂- und pH-Messung im Kulturmedium gewährleistet.

2.3.6 Prozeßkontrolle

Die Verarbeitung der Meßdaten wird von einem Programm übernommen, das speziell für die Erfordernisse des Bioreaktors in der graphischen, objektorientierten Programmierungsumgebung HP-VEE (Hewlett-Packard) entwickelt worden ist. HP-VEE ist speziell für meßtechnische Anwendungen konzipiert und verfügt über verschiedene vorgefertigte Objekte zur Datenerfassung und visuellen Darstellung. Im Gegensatz zu klassischen Programmiersprachen wird hier auf die Eingabe von Befehlsyntax bei der Programmerstellung weitgehend verzichtet und stattdessen durch graphische Verbindung funktionaler Module, sogenannte userfunctions und userobjects, ein ereignisorientierter Befehlsablauf ermöglicht (Abb. 2.10).

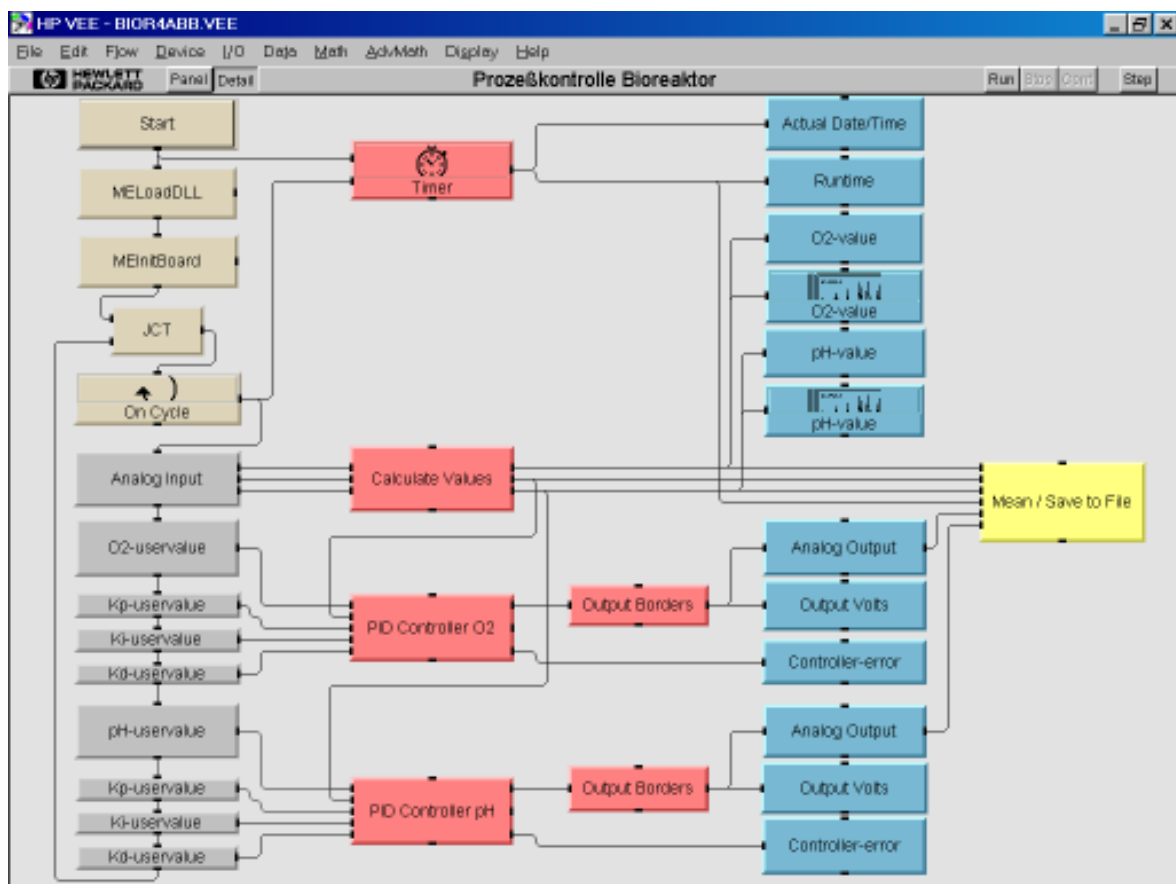


Abb. 2.10: Übersicht über das Programm zur PC-gestützten Prozeßkontrolle

Abfolge von userfunctions und userobjects:

beige: Programmstart, Laden der Befehlsbibliothek für die Meßkarte und Initialisierung sowie Programmschleife

grau: Einlesen der Meßwerte von der Meßkarte und der Eingaben des Anwenders

rot: Zeitermittlung, Berechnung der Meßwerte und der Stellgrößen

blau: Datenausgabe (Zahlenwerte und y/t-Diagramme)

gelb: Mittelwertbildung und Speicherung

(Zur besseren Übersicht sind in der Darstellung einige sekundäre Verbindungen weggelassen worden)

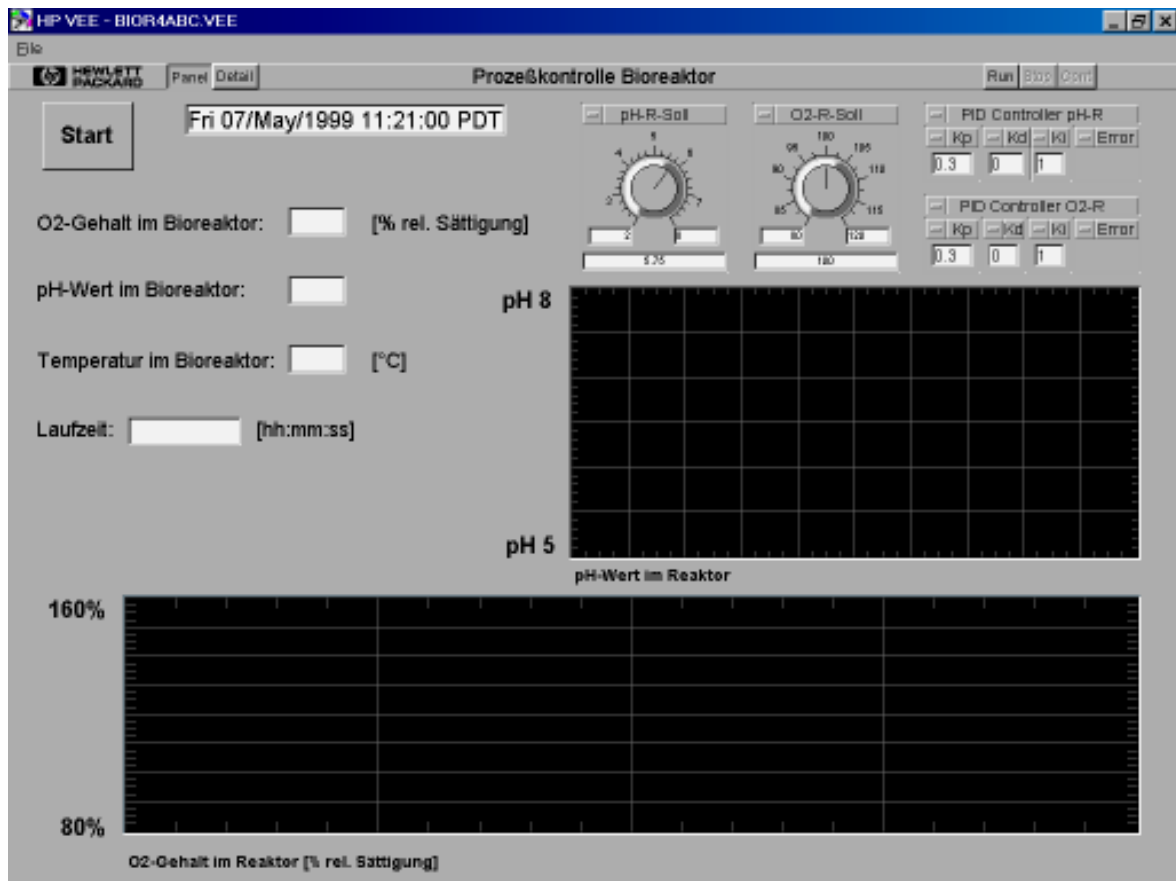


Abb. 2.11: Bildschirmansicht der PC-gestützten Prozeßkontrolle mit Windows-ähnlicher Benutzeroberfläche

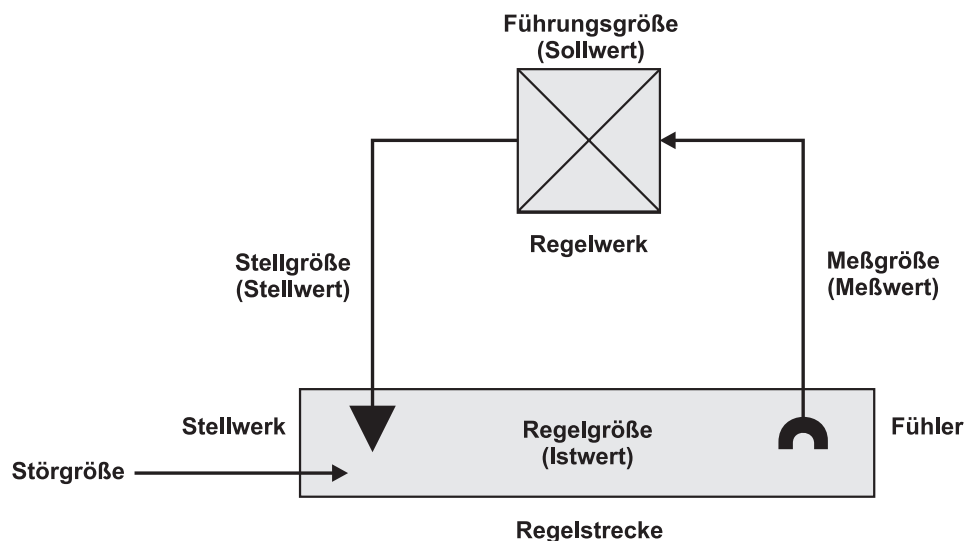


Abb. 2.12: einfacher Regelkreis, schematisch

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Programm verfügt über eine Schnittstelle zur Erfassung von Meßwerten, einen zentralen Teil zur Darstellung der Daten und zur Prozeßsteuerung sowie eine nachgeschaltete Schnittstelle zur Ausgabe von Stellwerten. Es wurde eine Windows 95-ähnliche Benutzeroberfläche entwickelt, die eine analoge und grafische Darstellung der Meßwerte sowie die Eingabe von Parametern für die Regelprozesse durch den Anwender ermöglicht. Die aufgenommenen Meßdaten werden sowohl als Zahlenwerte als auch in durchlaufenden y/t-Diagrammen über einen Zeitraum von 30 min dargestellt, arithmetisch gemittelt und auf Festplatte gespeichert (Abb. 2.11). Der zentrale Programmteil umfaßt zwei Regelkreise für die Einstellung eines konstanten pH-Wertes und konstante O_2 -Konzentration im Kulturmedium (Abb. 2.12). Dazu werden die aktuellen Meßwerte periodisch auf ihre Abweichung von den durch den Benutzer vorgegebenen Sollwerten verglichen und zur Berechnung der Stellgrößen verwendet. Diese werden als analoge Spannungssignale von der Meßkarte ausgegeben und steuern die Gasdosierung der peristaltischen Pumpen für O_2 und CO_2 in einem vorgegebenen Rahmen.

Optimierung der Stellparameter der Regelkreise für O_2 und pH

Es werden vorgefertigte PID-Reglermodule in das Programm zur Prozeßkontrolle des Bioreaktors eingebunden. Der PID-Regler verfügt über ein Proportional-, ein Integral- sowie ein Differential-Regelement. Die proportionale Regelung liefert eine der Abweichung von der Führungsgröße proportionale Stellgröße. Die integrale sowie die differenzielle Regelung berücksichtigt den über der Zeit dynamischen Verlauf der Regelgröße und verwendet das Integral bzw. das Differential der Abweichung von der Führungsgröße. Die Kombination und unterschiedliche Gewichtung der Regelemente ermöglicht die individuelle Anpassung an die jeweiligen meß- und regeltechnischen Anwendungen (Abb. 2.13). Die komplexe Regelung des PID-Reglers gewährleistet eine schnelle Korrektur der Regelgröße und verhindert gleichzeitig ein unkontrolliertes Schwingen.

Da sich das Wachstum und die Stoffwechselkinetik der Zellen in Zeiträumen von Stunden und Tagen vollzieht und damit auch der Einfluß auf die Regelgrößen im Reaktor, kann auf die Implementierung des sensitiven Differential-Regelements verzichtet werden. Die in der Prozeßkontrolle des Bioreaktors verwendeten Regler sind somit PI-Regler und auf Führung und nicht auf Störung optimiert. Für jedes Regelmodul stehen die Parameter k_p , k_i und k_d zur Einstellung durch den Anwender zur Verfügung. Sie können Werte zwischen Null und Eins annehmen und gewichten die Regelemente unterschiedlich stark. Sie bestimmen dadurch das dynamische Verhalten des Regelalgorithmus (Abb. 2.14).

Die optimalen Werte der Stellparameter oder Wichtungsfaktoren k_p für den Proportionalteil und k_i für den Integralteil wurden empirisch ermittelt. k_d für das Differentialelement wurde in beiden Regelkreisen auf Null gesetzt. Die Stellparameter werden einzeln und stufenweise erhöht und die Sprungantwort des Regelkreises nach Störung aufgenommen. Zunächst wurde der O_2 -Gehalt im zellfreien Kulturmedium des Reaktormoduls durch Stickstoffbegasung auf 10 % gesenkt und die Regelung nach Vorgabe für k_p und k_i gestartet.

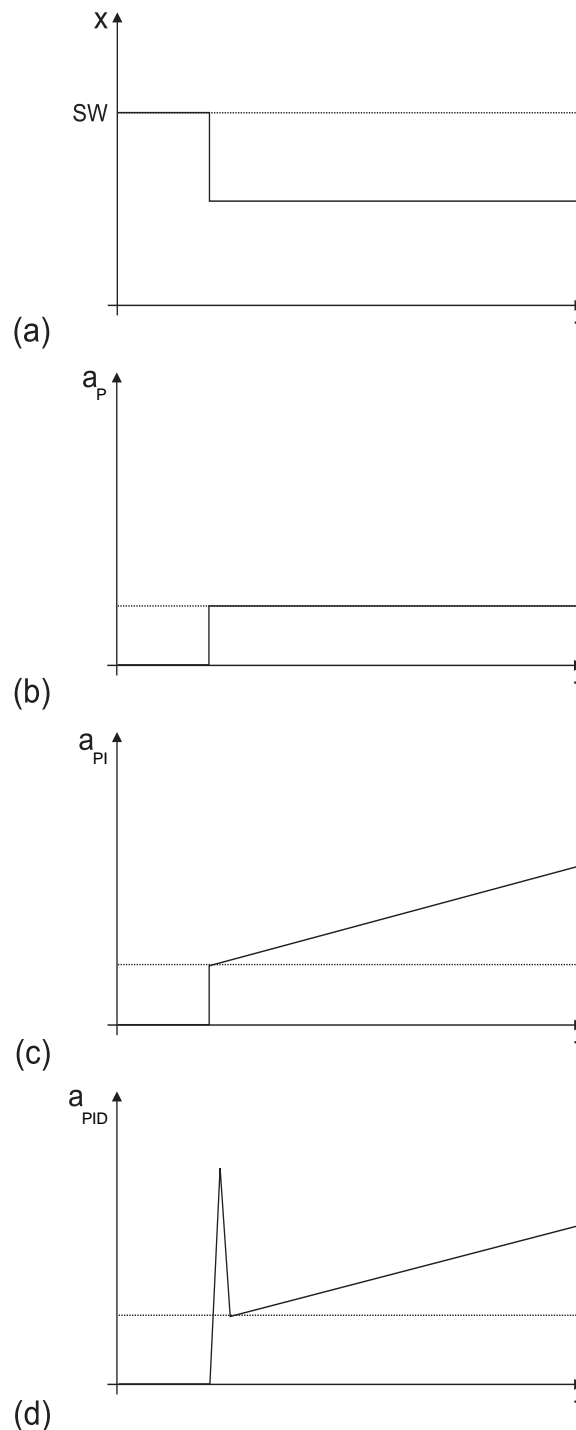


Abb. 2.13: Sprungantwort der unterschiedlichen Regler auf eine sprunghafte Änderung der Regelgröße (a: Stellgröße; SW: Sollwert)

- (a) Sprungfunktion (definierte, konstante Störung der Regelgröße)
- (b) Proportionalregler (P-Regler): Reagiert mit konstanter Stellgröße, die der Abweichung proportional ist
- (c) Proportional-Integralregler (PI-Regler): Reagiert auf die Störung sprunghaft und dann mit monoton steigender Stellgröße, solange die Abweichung besteht
- (d) Proportional-Integral-Differentialregler (PID-Regler): Vereinigt die drei Regeleigenschaften. Anfangs eine starke, aber begrenzte Änderung der Stellgröße (Nadelfunktion) durch den Differentialteil, die auf einen durch das Proportional-element festgelegten Wert abfällt (Plateau) und dann in den langsameren, integralen Anstieg der Stellgröße übergeht (Steigung).

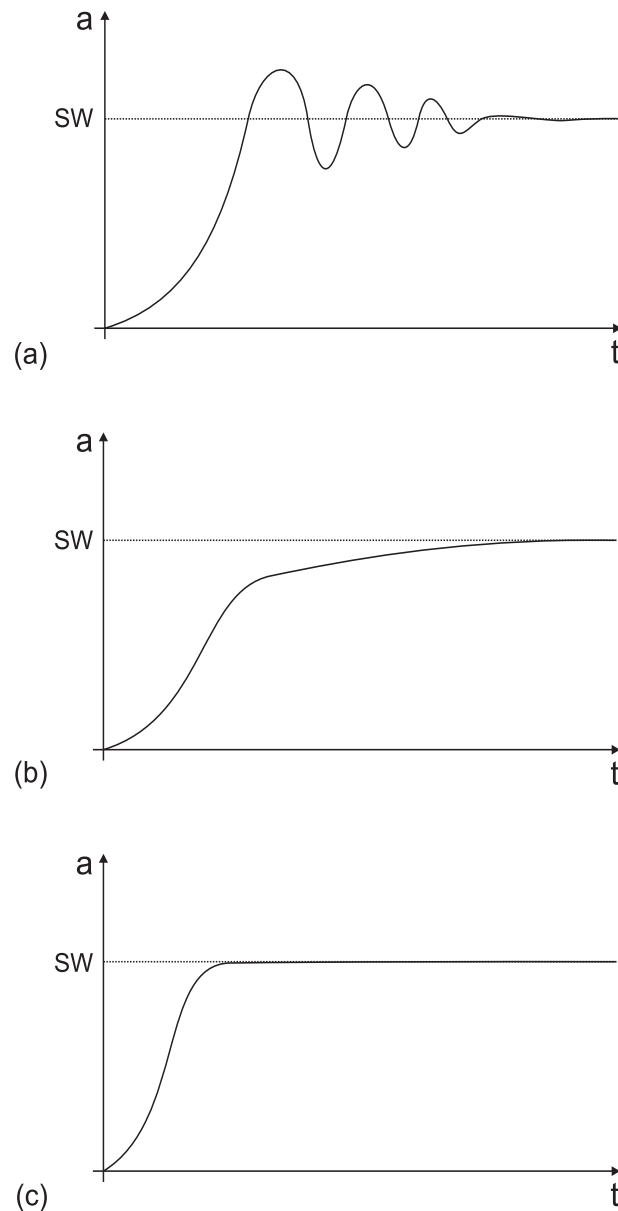


Abb. 2.14: Sprungantworten eines Reglers bei unterschiedlichen Einstellungen der Regelelemente (a: Stellgröße; SW: Sollwert)

- (a) Überschwingen der Regelung durch zu hohe Gewichtung des Proportional- oder des Differentialelements
- (b) Schleichende Korrektur der Regelung durch zu geringe Gewichtung des Proportionalelements
- (c) Optimale Regelung: schnelle Korrektur ohne Überschwingen

Dabei war die pH-Regelung außer Funktion. Der dynamische Verlauf des Anstiegs der O_2 -Konzentration im Kulturvolumen wurde aufgezeichnet. Für die Optimierung der pH-Regelung wurde ebenfalls durch Stickstoffbegasung der pH-Wert auf $pH = 7,9 - 8,3$ angehoben und die Sprungantwort nach Inbetriebnahme des Regelkreises aufgezeichnet. Dabei war nun die O_2 -Regelung außer Funktion.

Die Regler können nur eine einseitige Korrektur der Regelgrößen durch die Steuerung der Gaszufuhr vornehmen. Der O₂-Gehalt des Reaktors kann folglich nur nach oben und der pH-Wert nur nach unten korrigiert werden. Darüber hinaus sollten die Regelparameter unter Betriebsbedingungen eingestellt werden. So wurde für die Aufnahme der Sprungantworten ein konstanter N₂-Eintrag in das Kulturvolumen von 10 ml/min zur Ausgasung von O₂- und CO₂ eingerichtet (MENZEL ET. AL., 1998).

2.3.7 Enzymatische Bestimmung von Glucose, Lactat und Pyruvat im Kulturmedium

Die Bestimmung der Konzentrationen an Stoffwechselmetaboliten erfolgte über enzymatischen Umsatz in einem Automaten (Epos Analyzer 5060, Eppendorf-Netheler-Hinz).

Probenvorbereitung:

Die tiefgefrorenen Proben wurden 15 min bei 80 °C im Wasserbad aufgetaut und denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis (5 min) wurden alle unlöslichen Probenbestandteile durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 10 min bei 9000 U/min, Heraeus) abgetrennt und nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Messung im Enzymautomaten weiterhin auf Eis gelagert.

Glucosebestimmung:

Die Bestimmung der Glucose erfolgte in einem gekoppelten Enzymtest. Dabei wird die Glucose in einem ersten Schritt durch die Hexokinase in Glucose-6-Phosphat und in einer anschließenden Meßreaktion durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphoglucono-δ-Lacton umgesetzt. Dabei wird das Cosubstrat NADP⁺ als Protonenakzeptor zu NADPH reduziert, dessen Extinktionszunahme bei 334 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt wird (Untere Nachweisgrenze: 0,1 mM; obere Nachweisgrenze: 9,8 mM).

Lactatbestimmung:

Die Bestimmung des Lactats erfolgte über den Umsatz zu Pyruvat durch die Lactat-Dehydrogenase. Dabei wird direkt NAD⁺ zu NADH reduziert und die Extinktionszunahme bei 334 nm Wellenlänge photometrisch gemessen (untere Nachweisgrenze: 0,2 mM; obere Nachweisgrenze: 19 mM).

3 Ergebnisse

3.1 Primärkultur und Charakterisierung der Lutealzellen

3.1.1 Gewebepräparation

Die Ovarien des Rindes zeigten eine Vielzahl von Follikeln und Gelbkörpern unterschiedlichen Reifungsgrades (Abb. 3.1). Für die Gewebekultur wurden Gelbkörper aus dem Blütestadium (später Zyklus, 12. bis 15. Tag) verwendet. Diese waren von rundlich ovaler Gestalt, 3 cm im maximalen Durchmesser, und hatten im Bereich der Ovulationsstelle eine wulstige Vernarbung.

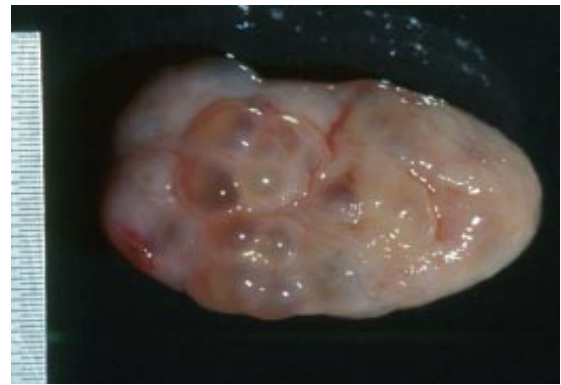


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Ovars eines Rindes mit Follikeln und Gelbkörpern unterschiedlichen Reifungsgrades (aus RÜSSE UND SINOWATZ, 1991)

Sie ließen sich leicht durch ihre rötlich-gelbe Färbung und zunehmende periphere Vaskularisierung von jungen Gelbkörpern (1. bis 12. Tag) unterscheiden. Die atretischen Gelbkörper des späten Zyklus (16. bis 21. Tag) wiederum fielen durch ihre zunehmende zitronen- bis blaßgelbe Färbung und eine massive bindegewebige Verkapselung sowie Vernarbung auf. Außerdem nahmen sie an Größe ab (Abb. 3.2). Die feste bindegewebige Kapsel der Gelbkörper erlaubte eine einfache Präparation aus dem Ovarialgewebe.



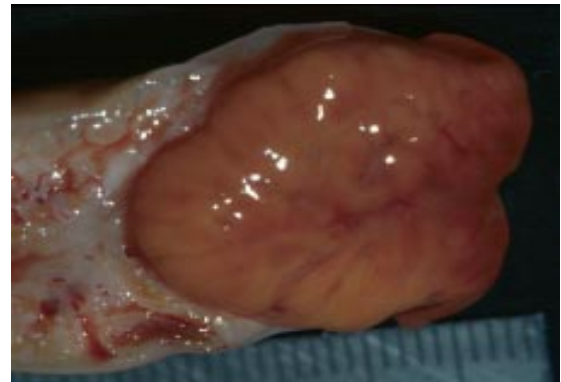
(a)



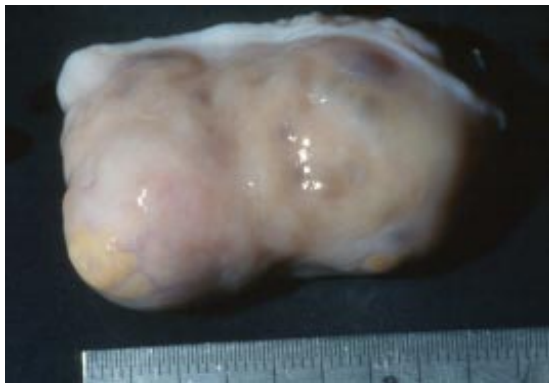
(b)



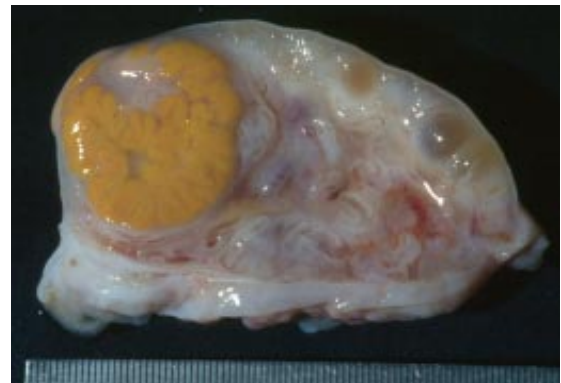
(c)



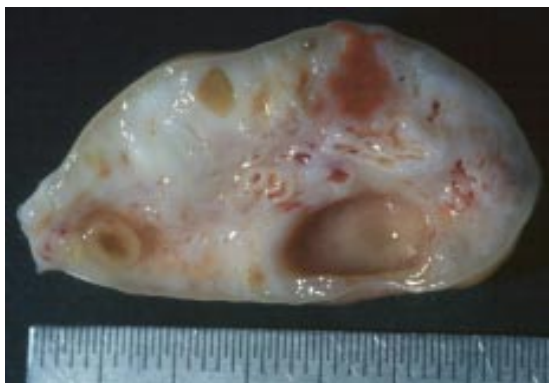
(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Abb. 3.2: Ovarien mit Gelbkörpern unterschiedlichen Reifungsgrades nach Organentnahme

- | | |
|--|---|
| (a) Ovar mit präovulatorischem Follikel | (b) Ovar mit frisch ovuliertem Follikel |
| (c) Ovar mit Gelbkörper im Blütestadium | (d) Gelbkörper im Blütestadium, Anschnitt |
| (e) Ovar mit Gelbkörper, Zyklusende | (f) Gelbkörper, Zyklusende, Anschnitt |
| (g) Ovar mit atretischem Gelbkörper, Anschnitt | (h) Ovar mit Superovulation |

Durch den enzymatischen Verdau nach Injektion der Enzymlösung verloren die Gelbkörper an Festigkeit. Nach Öffnen der Kapsel konnte das parenchymatöse Lutealgewebe herausgezupft werden und zerfiel zum Teil bereits spontan nach Aufnahme in Kulturmedium zu einer gelblichen Suspension. Über die zusätzliche mechanische Dissoziation wurde eine Primärsuspension ohne größere Gewebeanteile gewonnen. Durch diese Präparation konnten z.B. aus 14,38 g Ovarialgewebe 0,43 g dissoziierte Lutealzellen gewonnen und somit $6,3 \times 10^9$ Zellen isoliert werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Beispiel der Bilanzierung einer Lutealzellpräparation aus dem Ovar

Arbeitsschritt	Gewebe- / Zellmasse
Gewicht des Eierstocks	14,38 g
Gewicht des Gelbkörpers (freipräpariert)	4,93 g
Gelbkörper ohne bindegewebige Kapsel	3,45 g
Lutealgewebe nach Verdau	3,02 g
Zellmasse für Primärsuspension nach mechanischer Dissoziation	0,43 g
Volumen der Primärsuspension	30 ml
Zelldichte in der Primärsuspension	$2,1 \times 10^8$ Zellen/ml

3.1.2 Allgemeine Kultivierung der Lutealzellen

Die präparierten Zellen wurden in den ersten 48 h erschütterungsfrei kultiviert und anschließend der Überstand mit nicht haftenden Zellen durch vorsichtiges Dekantieren abgossen und verworfen. Eine initiale Anheftung konnte über die ersten 48 h hinaus nicht beobachtet werden. Haben sich die Zellen in dieser Phase erfolgreich angeheftet und auf der Trägoberfläche ausgespreitet, war anschließend mehrfaches Passagieren möglich.

Die primäre Anheftung der Lutealzellen konnte durch Beschichtung der Kulturflächen mit Collagen deutlich verbessert werden. Die T-Flaschen für die Anzucht der Zellen sowie die Multiwell-Platten sind aus Polystyrol gefertigt und tragen je nach Hersteller eine unterschiedliche Oberflächenbeschichtung im Kulturraum, welche die Anheftung von Zellen fördern soll. So konnte nach der ersten Passage auf eine weitere Collagenbeschichtung verzichtet werden, ohne daß sich die Zellanheftung verschlechterte. Für die Anzucht von Lutealzellen auf Glasplättchen für die cytologischen Präparationen und mikroskopischen Untersuchungen wurde weiterhin eine Collagenbeschichtung vorgenommen, da diese Oberflächen für eine spontane Zellanheftung ungeeignet sind und die Zellen gerade wegen der mechanischen Beanspruchung während der Waschprozeduren und Inkubationen besonders gut am Träger haften müssen.

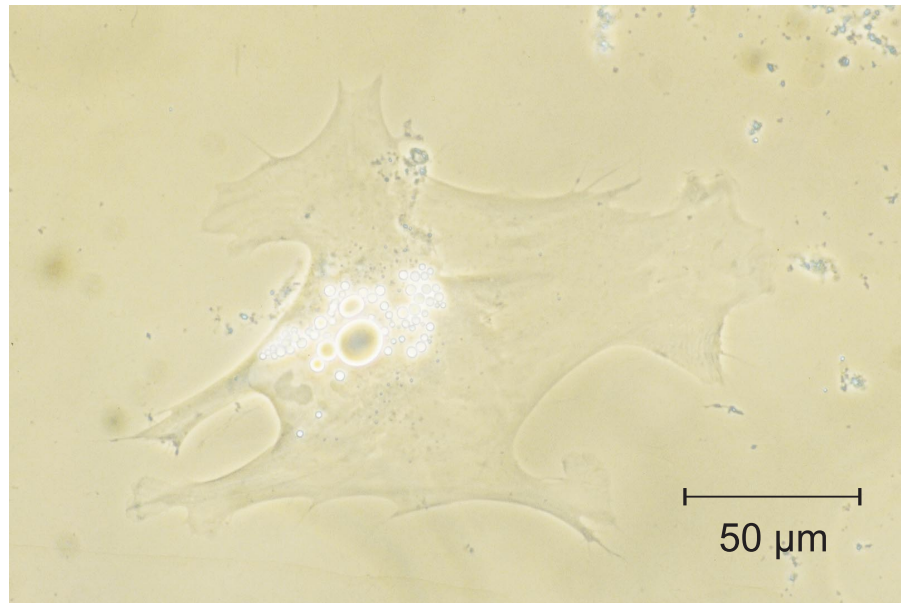
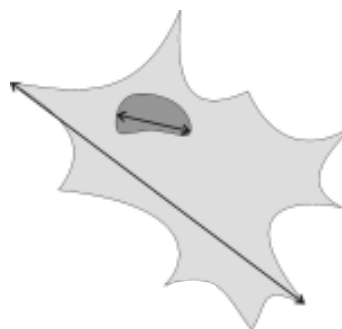


Abb. 3.3: Lutealzelle auf collagenisiertem Glasträger 7d nach Inkulturnahme (Phasenkontrast)

Die Lutealzellen spreiteten sich nach Anheftung innerhalb von wenigen Stunden mit zahlreichen breiten Fortsätzen sehr flach aus und der nierenförmige Zellkern wurde mikroskopisch sichtbar (Abb. 3.3). Der größte Zelldurchmesser der ausgespreiteten Zellen liegt im Mittel bei 110 µm ($s = \pm 11,6$; $n = 14$), der Kerndurchmesser bei 25 µm ($s = \pm 1,4$; $n = 14$) (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Beispiel einer Messung des größten Durchmesser adhärenter Lutealzellen und ihres Zellkerns

Zelle [µm]	Zellkern [µm]
123	26
105	24
109	25
125	22
102	23
112	25
98	27
126	25
94	25
118	26
90	26
105	25
110	24
121	27
$\bar{x} = 110$	$\bar{x} = 25$
$s = \pm 11,6$	$s = \pm 1,4$



Der perinukleäre Bereich war deutlich verdickt und zeigte selbst bei hoher Zellteilungsaktivität eine Reihe von Vesikeln, die im Phasenkontrast hell erscheinen. Stellten die Zellen das Teilungswachstum ein, so stieg die Anzahl an Vesikeln im perinukleären Bereich deutlich an. In Suspension waren die Zellen kugelig abgerundet, von orange-gelber Färbung

und erschienen aufgrund der zahlreichen Vesikeln granulär. Die enzymatische und mechanische Dissoziation bei der Präparation der Zellen lieferte neben Einzelzellen auch Aggregate von mehreren Zellen. Bereits wenige Stunden nach Inkubation lösten sich einzelne Zellen aus den Zellverbänden heraus und nahmen mit langen cytoplasmatischen Fortsätzen Kontakt mit der Kulturfläche auf (Abb. 3.4). Nach 24 h waren sie vollständig vom Verband getrennt und bildeten einen Hof um den verbliebenen Rest des Zellaggregats.

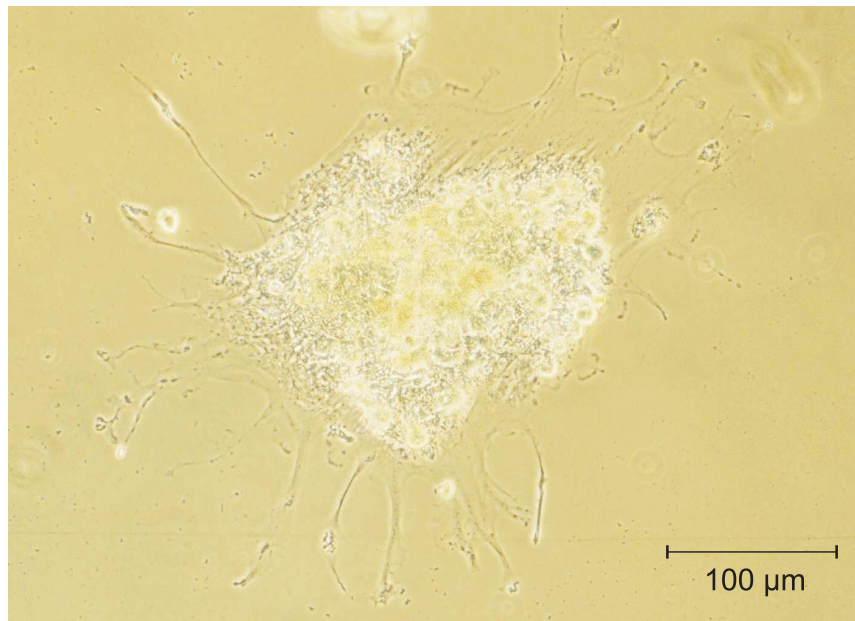


Abb. 3.4: Auswachsen von Lutealzellen aus einem Zellaggregat 2 Tage nach Gewebepreparation

Die überwiegende Zahl der Kulturexperimente wurde mit Lutealzellen aus einzelnen Gewebepreparationen durchgeführt. Durch Optimierung der Kulturbedingungen war es möglich, die Zellen in erheblichem Umfang in Kultur zu vermehren, eine Kryokonservierung zu etablieren und eine Wiederanzucht nach mehreren Monaten durchzuführen. So konnte aus der Präparation vom 12.01.1999 eine Stammkultur angelegt werden, die für alle nachfolgenden Kulturexperimente verwendet werden konnte.

Eine cytologische Vitalfärbung mit Eosin B oder Methylenblau als Zellvitalitätsmarker (Farbstoff-Ausschlußtest) war nicht möglich. Die Farbstoffe wurden selbst von ethanollysierten Zellen nicht aufgenommen. Daher wurde auf eine regelmäßige Vitalitätskontrolle verzichtet.

3.1.3 Cytologische Charakterisierung der Lutealzellen

Zunächst war es nötig, die aus dem Gewebe der Gelbkörper präparierten Zellen über cytologische Untersuchungen als Lutealzellen zu identifizieren.

Nachweis von Lipoidvesikeln

Über eine cytologische Vital-Färbung mit Sudan III konnten die schon im Phasenkontrast auffälligen Vesikeln der Lutealzellen als lipoidhaltig identifiziert werden (Abb. 3.5). Die Vesikeln zeigten unter mikroskopischer Betrachtung im Hellfeld gelbe bis rot-violette Färbung. Die Kombination mit Phasenkontrast ermöglichte die Lokalisierung der gefärbten Vesikel im Cytoplasma der Lutealzellen.

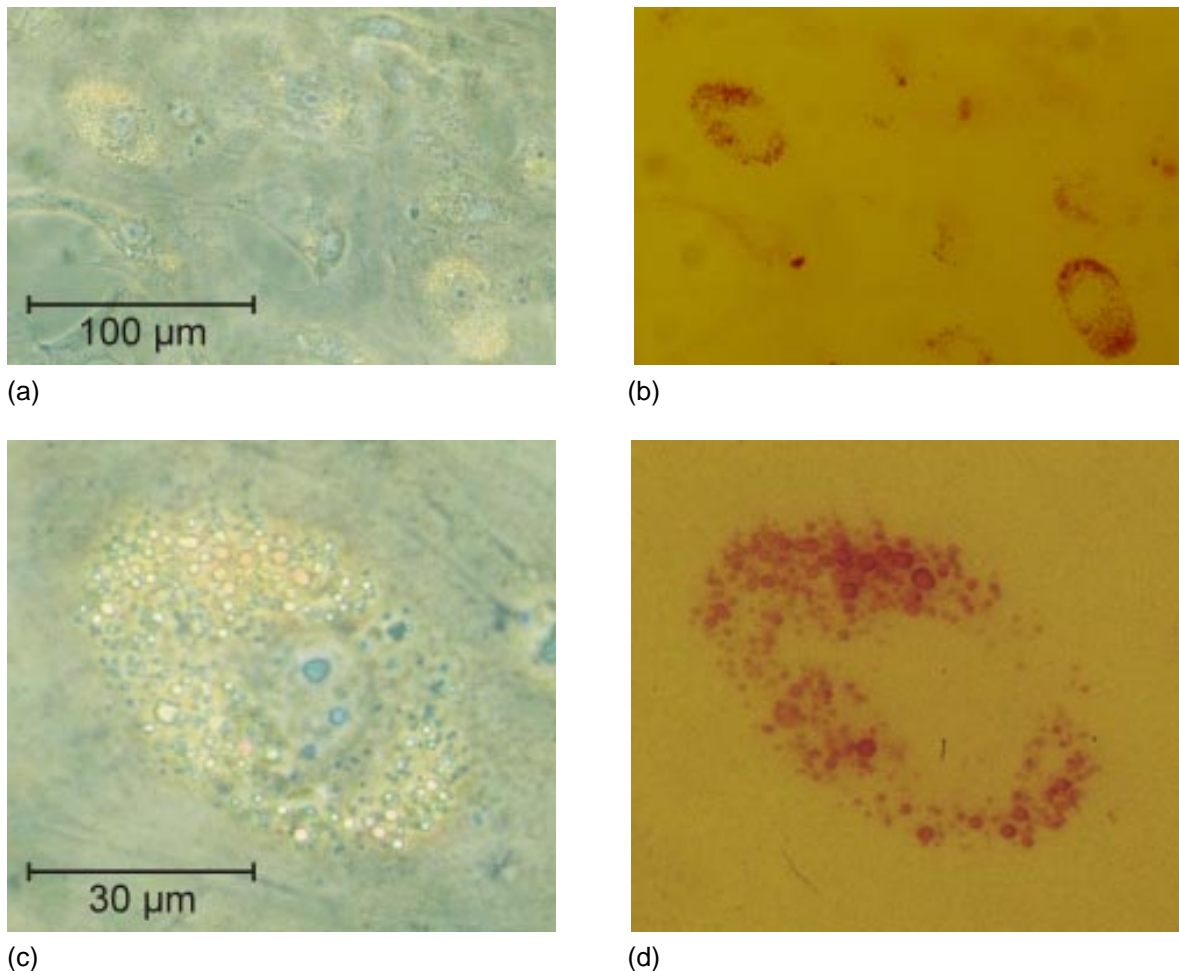


Abb. 3.5: Nachweis von Lipoid-Vesikeln über cytologische Färbung mit Sudan III
Bild (a) und (c) im Phasenkontrast; Bild (b) und (d) im Hellfeld

Nachweis der Steroidsynthese

Mit einem spezifischen cytochemischen Enzymtest war es möglich, die Progesteronsynthese der präparierten Lutealzellen anhand eines Schlüsselenzyms nachzuweisen. Über den Umsatz des chromogenen Substrats NBT zu einem unlöslichen amorphen, braun-violetten Formazan-Niederschlag konnte die Aktivität der $\Delta^5\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (β -HSD) qualitativ nachgewiesen werden (Abb. 3.6).

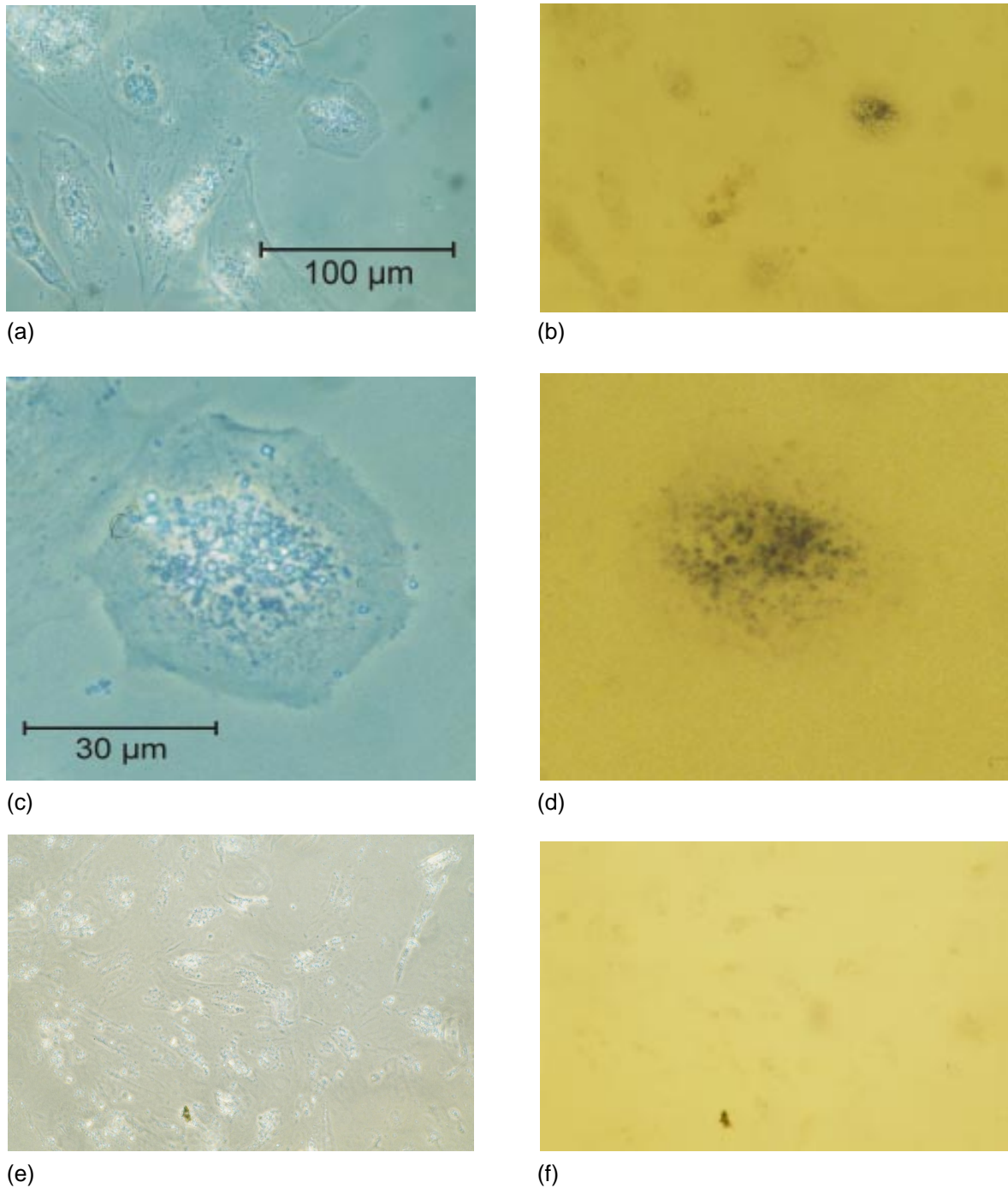


Abb. 3.6: Nachweis der Steroidgenese über enzym-cytochemischen Nachweis der Aktivität der $\Delta^5\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) über Bildung eines intrazellulären amorphen Formazan-Niederschlags

Bilder links im Phasenkontrast (a), (c), (e)

entsprechende Abbildungen rechts im Hellfeld (b), (d), (f)

(a) Lutealzellen auf kollagensiertem Glasträger, 7 Tage in Kultur

(c) Ausschnitt aus (a)

(e) Fibroblasten der Maus (A9) als Negativkontrolle

Nachweis der LH-Rezeptoren

Über die Entwicklung und Anwendung eines Fluoreszenzmarkers war es möglich, die für Lutealzellen typischen LH-Rezeptoren mikroskopisch zu lokalisieren. Dazu wurde zunächst das Proteohormon hCG mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC kovalent gekoppelt und das entstandene Konjugat über Gelelektrophorese und Fluoreszenzmessung des Bandenmusters überprüft (Abb. 3.7).

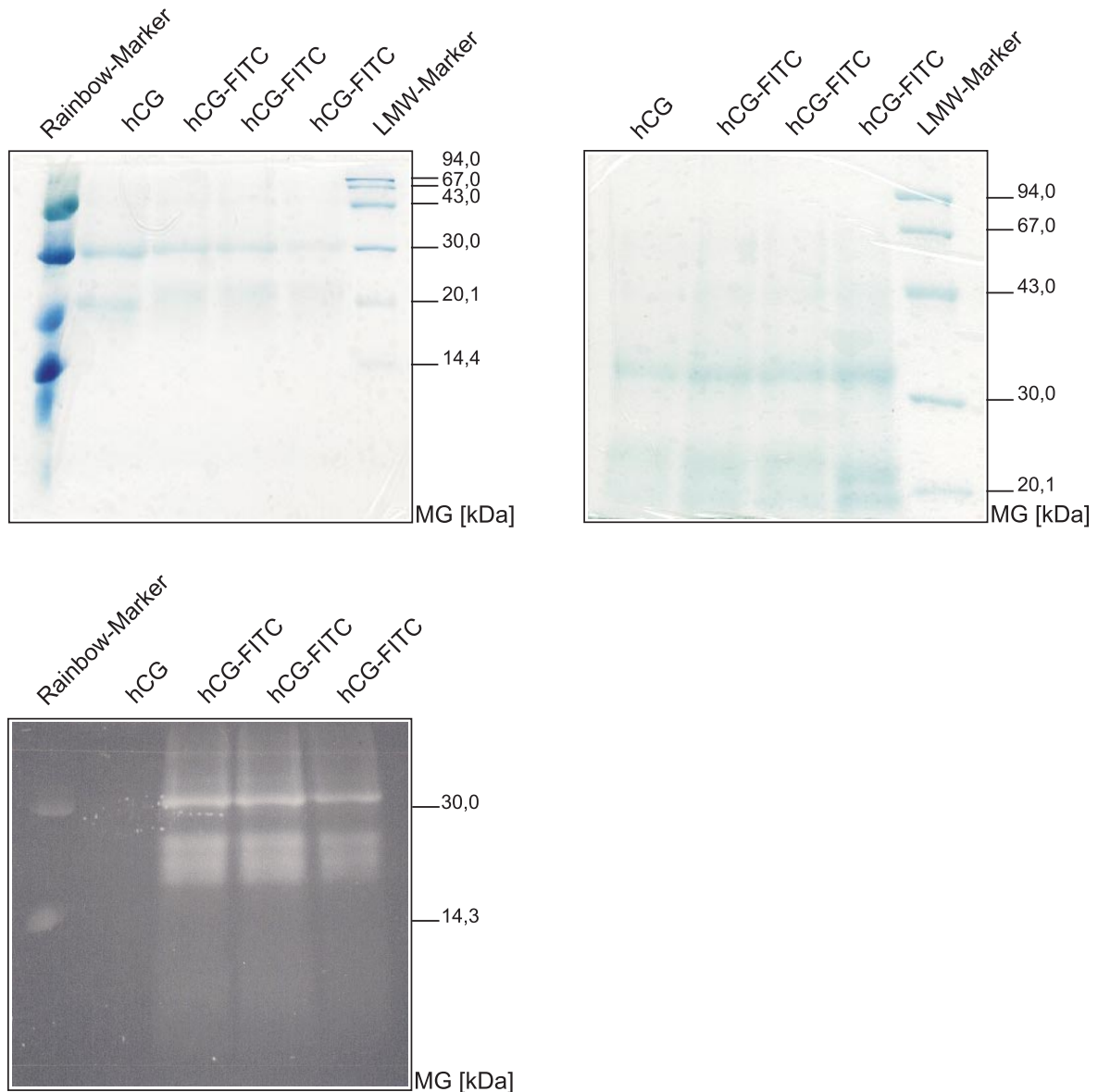


Abb. 3.7: Kontrolle der Kupplung von FITC an hCG mittels SDS-PAGE
 oben links: SDS-PAGE, 14 %, Proteinfärbung mit Coomassie-Blau
 unten rechts: das gleiche Gel wie oben links, unter UV-Beleuchtung (vor der Färbung)
 oben rechts: SDS-PAGE, 13 %, Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Auf Coomassie-Blau gefärbter 14%-iger SDS-PAGE war eine deutliche Bande bei 30 kDa zu finden. Zwei weitere Banden, die nicht scharf voneinander getrennt waren, lagen bei 20 kDa. Dieser Bereich ließ sich in einer 13%-igen SDS-PAGE besser auflösen und es wanderten zwei deutliche Banden bei ca. 19 und 21 kDa. Diese Banden entsprachen dem

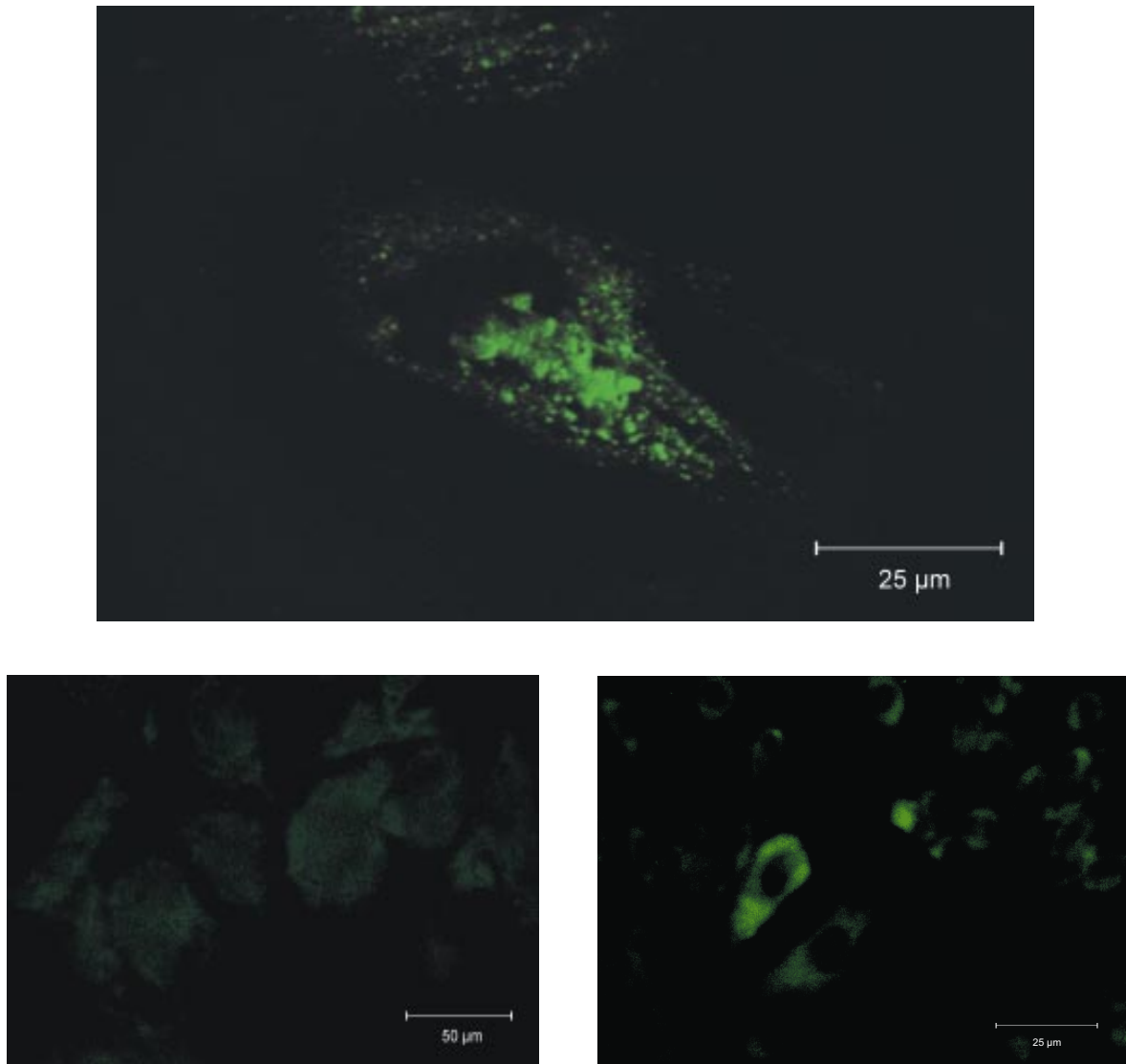


Abb. 3.8: Fluoreszenznachweis der LH-Rezeptoren über die Bindung eines Konjugats aus hCG und FITC

oben: Lutealzelle mit Fluoreszenz im perinukleären Bereich. Der nierenförmige Zellkern zeigt keine Fluoreszenz. Das Cytoplasma der weit ausgespreiteten Zelle nimmt in etwa die Fläche des gewählten Bildausschnitts ein (3 % Laserleistung bei 488 nm, Pinhole 0,7 µm)

unten links: HEP-G2-Zellen als Negativ-Kontrolle (Lebertumorzellen); Anzucht und Färbung wie oben. Geringe Fluoreszenz ist diffus über das Cytoplasma verteilt. Leberzellen zeigen, neben einer Eigenfluoreszenz, eine starke Pino- und Phagocytose; die Aufnahme des hCG-FITC ist wahrscheinlich unspezifisch (30 % Laserleistung bei 488 nm, Pinhole 3,1 µm).

unten rechts: A9-Mausfibroblasten (embryonal) als Negativkontrolle (10 % Laserleistung bei 488 nm, Pinhole 8 µm)

heterodimeren Peptidhormon hCG und seinen beiden Untereinheiten. Durch Vergleich mit dem Fluoreszenzbandenmuster des Gels unter UV-Anregung konnte die Fluoreszenz dem hCG-FITC-Konjugat zugewiesen werden.

Die Lutealzellen zeigten nach Inkubation mit dem Konjugat eine deutliche und spezifische Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die hoch spezifische Fluoreszenz war nicht nur auf der Oberfläche der Zellen zu finden, sondern auch über das gesamte

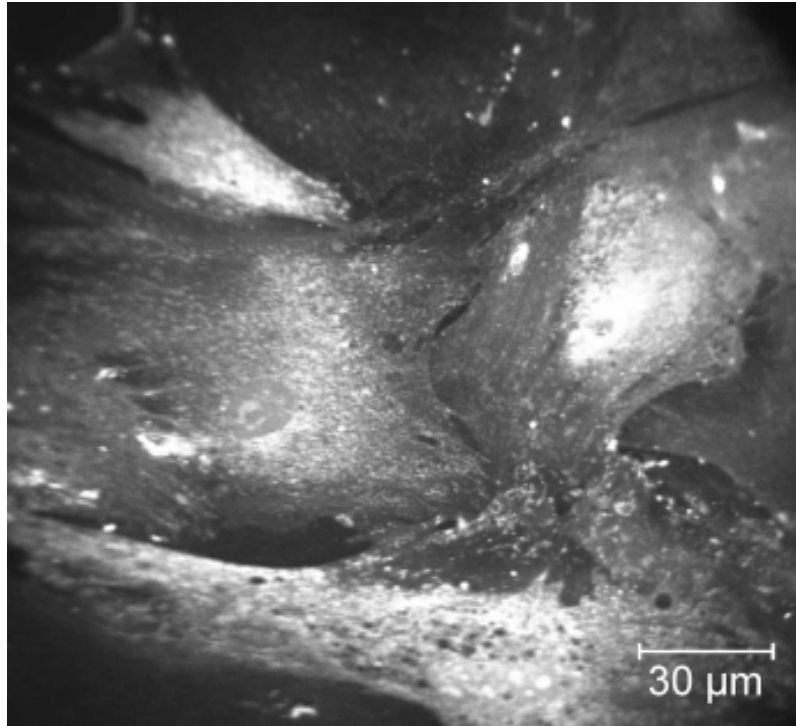


Abb. 3.9: Überkonfluent gewachsene Lutealzellen
(Fluoreszenzaufnahme, Konfokales Laserscan-Mikroskop, 3 % Laserleistung, Pinhole 7,2 µm)

Cytoplasma verteilt und im vesikelreichen perinukleären Bereich besonders stark (Abb. 3.8). Bei geringer Anregungsenergie des Lasers und geschlossenem Pinhole zeigte sich die Fluoreszenz auf diesen perinukleären Bereich beschränkt (vgl. 2.2.2). Durch Öffnen des Pinholes und mit erhöhter Anregungsenergie ließ sich die Fluoreszenz über die gesamte Zelle verteilt erkennen und erlaubte darüberhinaus eine vollständige Abbildung der Lutealzellen (Abb. 3.9).

3.1.4 Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro

Die Lutealzellen zeigten nach Inkulturnahme über eine Zeitspanne von mehreren Tagen die Fähigkeit zur Progesteronproduktion. Vergleicht man die Produktionsraten in parallelen Ansätzen, so fällt der sehr einheitliche Verlauf über der Zeit auf. Die Progesteronproduktion ist weiterhin dem eingesetzten Volumen an Primärsuspension bei gleichem Volumen-Kulturflächen-Verhältnis proportional (Abb. 3.10). So produzierten Lutealzellen in kleinen T-Flaschen mit einem Drittel des Kulturvolumens und der Kulturfläche gegenüber Lutealzellen in großen T-Flaschen nur ein Drittel der Progesteronmenge. So wurden auf 75 cm² T-Flaschen im Mittel in den aufeinander folgenden Intervallen 101, 52, 36 und 38 pmol/d (n = 6) gegenüber 31, 13, 10 und 10 pmol/d auf 25 cm² T-Flaschen (n = 5) produziert.

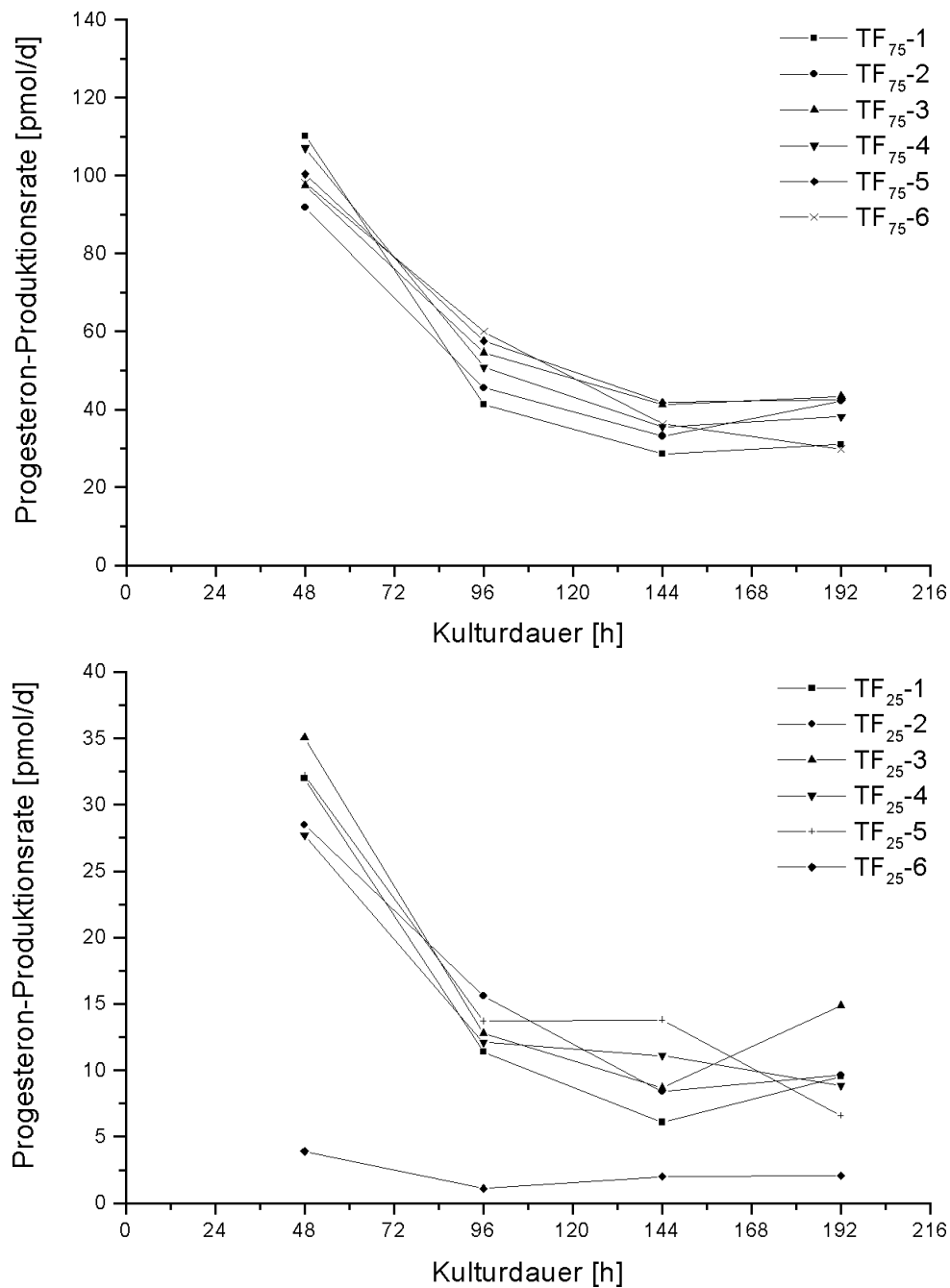


Abb. 3.10: Untersuchung der Progesteronproduktion von Lutealzellen in vitro

Darstellung der Produktionsraten an Progesteron in pmol/d als Funktion der Kulturdauer.

oben: Kultur in 75 cm² T-Flaschen

unten: Kultur in 25 cm² T-Flaschen

Lutealzellen wurden zunächst für drei Tage aus der Primärsuspension auf 75 cm² und 25 cm² T-Flaschen vorkultiviert, anschließend die Zellüberstände in Abständen von 48 h abgenommen und auf ihren Gehalt an Progesteron untersucht.

Nach zweifachem Waschen mit PBS wurden die Kulturflaschen wieder mit neuem Medium versehen. Ein Ansatz (TF₂₅-6: 6.T-Flasche, 25 cm²) zeigte über die gesamte Kulturdauer sehr geringe Progesteronkonzentrationen und wurde daher für die Berechnung der mittleren Progesteronkonzentration und -produktion nicht verwendet.

Zellwachstum und Progesteronproduktion

In T-Flaschen (25 cm²) konnte über einen Zeitraum von 147 h das Zellwachstum von Lutealzellen untersucht werden.

Dazu wurden 1×10^7 Zellen in Kulturvolumina von jeweils 5 ml und 25 cm² Kulturfläche ausgesät und die Zellzahlen in Abständen von wenigen Stunden bis zu 1 Tag bestimmt. Die Wachstumskurven für zwei Kulturversuche sind in Abb. 3.11 dargestellt. Sie zeigen einen sigmoiden Verlauf. Bereits nach einem Tag stieg die Zelldichte an, durchlief nach 72 h eine maximale Zunahmerate und erreichte nach 120 Stunden ein Plateau bei $1,3 \times 10^7$ bis $1,4 \times 10^7$ Zellen/ml KV. Für eine T-Flasche mit 5 ml Kulturvolumen und 25 cm² Kulturfäche ergibt sich daraus eine Zelldichte des Monolayers von ca. 3×10^6 Zellen/cm². Anhand der maximalen Zunahme der Zelldichte pro Zählintervall ließ sich die größte Teilungsrate (dN/dt) und als Reziprokwert die kürzeste Verdopplungszeit graphisch ermitteln. Die größte Teilungsrate lag für die Lutealzellen bei 1,25 /d, ihre Verdopplungszeit betrug 30 h.

Die Lutealzellen wuchsen über Einzelzellklone zu konfluenten Layern heran. Im dichten Zellverband ging das Zellteilungsvermögen zurück, die Zellen verloren zunächst ihre flache Form und reduzierten ihre cytoplasmatischen Fortsätze. Sie konnten aber durch weitere Zellteilung zu überkonfluenten Layern heranwachsen, wobei sie sich schließlich partiell überlappten (Abb. 3.9).

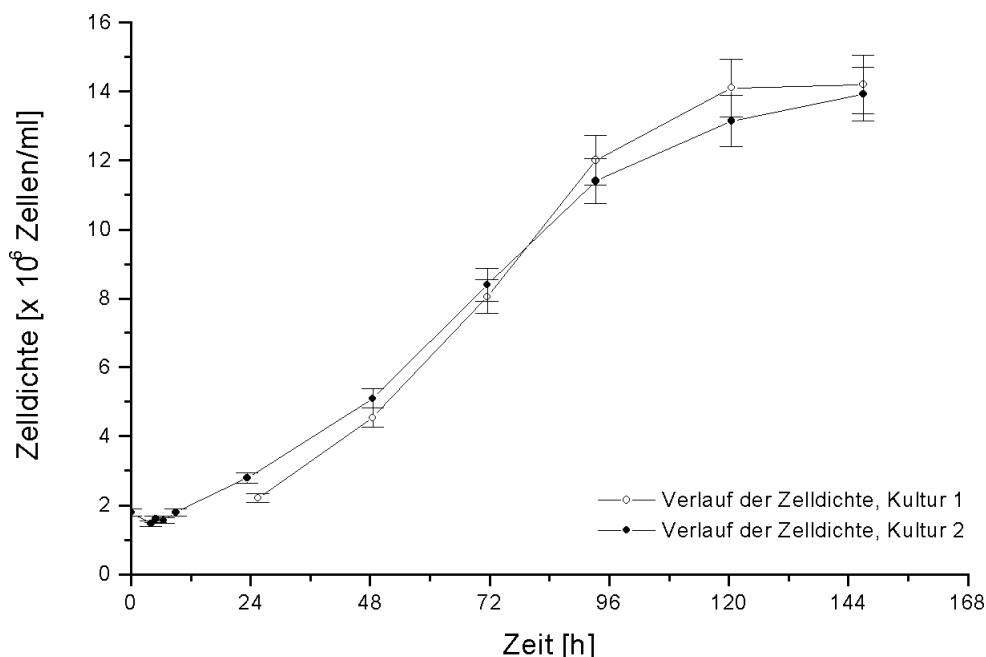


Abb. 3.11: Wachstumskurven der Lutealzellen in T-Flaschen-Kultur (25 cm², 5 ml KV)

Für den Versuch „Kultur 1“ wurden insgesamt 12 Kulturflaschen eingesetzt und nach jedem Intervall jeweils zwei verwendet. Aus jeder Kulturflasche wurden nacheinander vier Proben entnommen und diese in der Zählkammer jeweils doppelt ausgezählt. Für den Versuch „Kultur 2“ wurden insgesamt 17 Kulturflaschen eingesetzt und nach jedem kurzen Intervall jeweils eine, nach jedem Tagesintervall zwei verwendet. Aus jeder Kulturflasche wurden nacheinander vier Proben entnommen und diese in der Zählkammer jeweils doppelt ausgezählt. Es sind die arithmetischen Mittelwerte für jedes Probenintervall angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen der über alle ausgezählten Proben gemittelten prozentualen Standardabweichung von 5,95 % für den Versuch „Kultur 1“ und 5,61 % für „Kultur 2“.

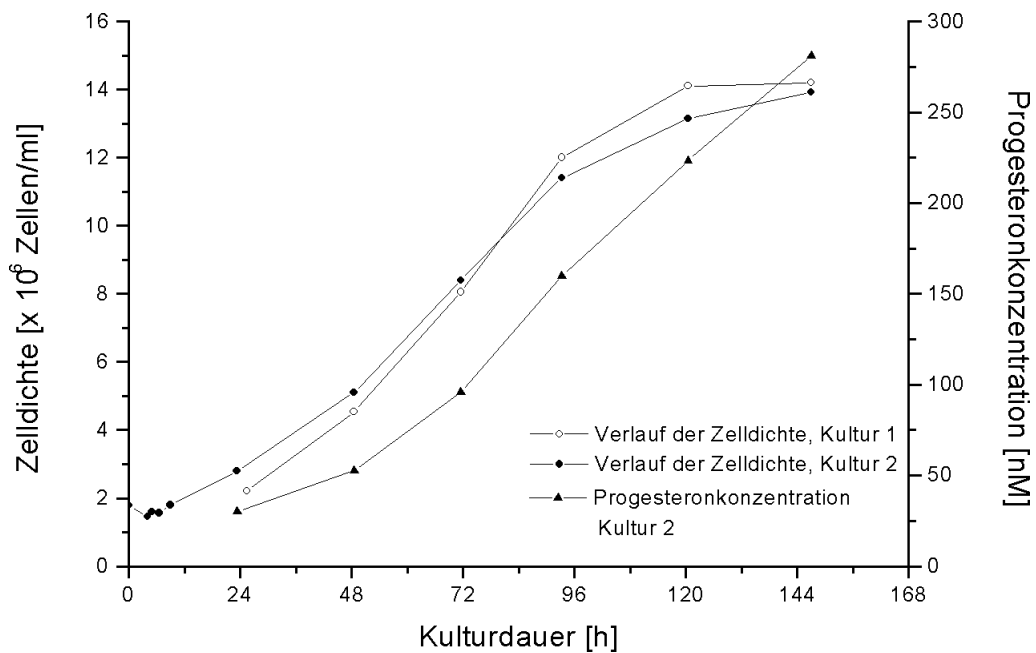


Abb. 3.12: Wachstumskurven der Lutealzellen und Progesteronkonzentration im Medium
Die Medienüberstände der ausgezählten Flaschen aus Versuch „Kultur 2“ wurden auf ihren Progesterongehalt untersucht. Die einzelnen Werte beziehen sich auf die jeweils längere Kulturdauer.

Die Zellüberstände wurden bei jeder zu zählenden Kultur abgenommen und auf ihren Progesterongehalt untersucht. So konnte der zu charakterisierenden Zellpopulation eine im Zeitintervall produzierte Progesteronmenge zugeordnet werden. Unter Verwendung der mittleren Zelldichte im Kulturintervall ließen sich somit in erster Näherung spezifische Progesteronproduktionsraten für die Lutealzellen ermitteln. Sie lagen zwischen 8,3 und 21 pmol/10⁶ Zellen*d, bzw. 8,3 und 21 x 10⁻¹⁸ mol/Zelle*d (Abb. 3.13). Dies entspricht immerhin einer durchschnittlichen Sekretion von 10.000 bis 100.000 Progesteronmolekülen pro Tag für jede Zelle in der Kultur.

Für die weiteren Kulturexperimente wurden daher die ermittelten Progesteronproduktionsraten als Leistungsmaß zur Charakterisierung der Lutealzellpopulationen verwendet. Dabei wurde außer acht gelassen, ob eine Änderung der Progesteronproduktion auf einer unterschiedlichen Zelldichte oder einer veränderten spezifischen Produktion und Sekretion der Zellen beruht.

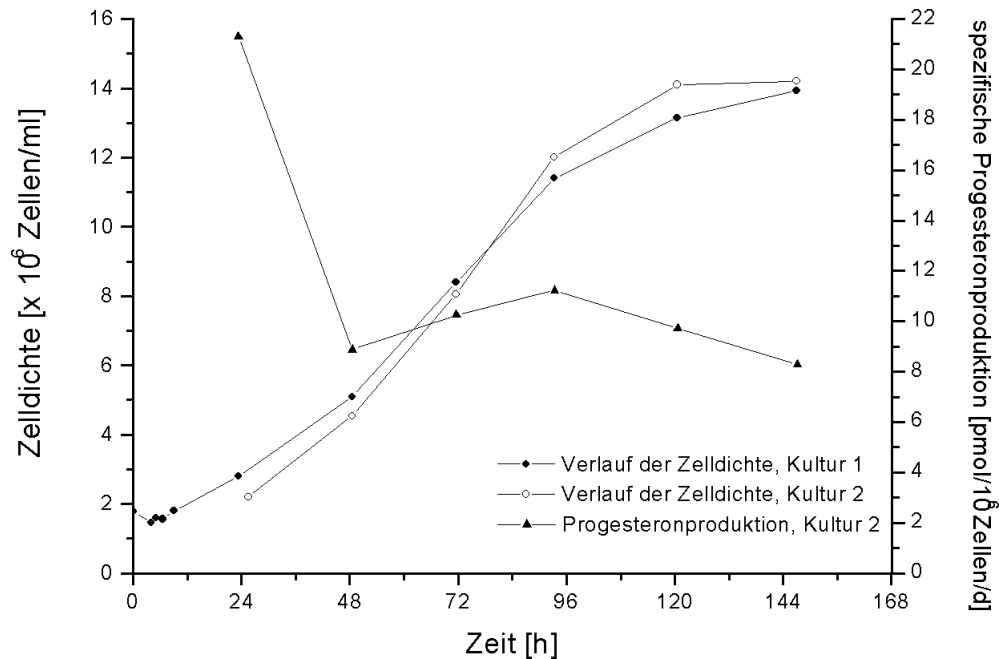


Abb. 3.13: Wachstum und Progesteronproduktion der Lutealzellen

Neben der Zelldichte ist die Progesteronproduktion in pmol, bezogen auf 10^6 Zellen über die Kulturdauer von 168 Stunden aus Versuch „Kultur 2“ dargestellt.

3.1.5 Isolierung von Lutealzellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Lutealzellen lassen sich durch Dichtegradientenzentrifugation aus der Primärsuspension abtrennen und in Reinkultur nehmen. Dazu wurden die Suspensionen auf einen Percoll-Gradienten der Dichte $\rho = 1,010$ bis $\rho = 1,184$ aufgeschichtet (Abb. 3.14) und durch isopyknische Zentrifugation in Populationen von Partikeln unterschiedlicher Dichte aufgetrennt. Die Lutealzellen bandierten bei einer Dichte zwischen $\rho = 1,034$ und $\rho = 1,040$ im Gradienten und konnten nach Fraktionierung mikroskopisch untersucht werden. Durch Fluoreszenzmarkierung der kultivierten Zellen vor der Zentrifugation war es weiterhin möglich, die Lutealzellfraktion über eine fluoreszierende Bande zu definieren und mit dem Bandenmuster einer im Gradienten aufgetrennten Primärsuspension zu vergleichen (Abb. 3.15).

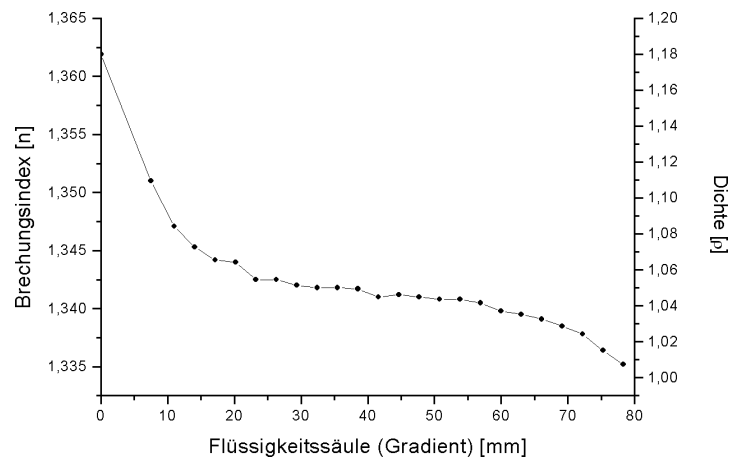


Abb. 3.14: Durch Ultrazentrifugation gebildeter Percoll-Gradient
(30.000 g, 45 min, Startdichte $\rho = 1,055$)

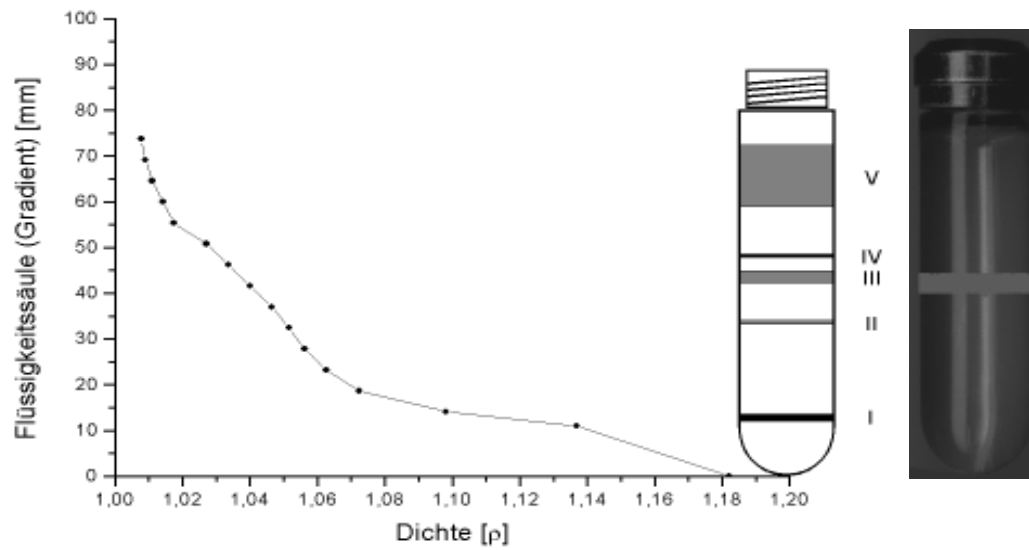


Abb. 3.15: Fraktionierte Primärsuspension nach Auftrennung im Dichtegradienten
 (400 g, 45 min, Startdichte $\rho = 1,055$)
 Mitte: Es bilden sich fünf Banden aus, die nach Fraktionierung des Gradienten mikroskopisch untersucht wurden: I, Erythrozyten; II, Percoll-Artefakt; III Lutealzellen; IV unbestimmte Zellen; V, Zell- und Gewebedetritus; rechts: Auftrennung einer Lutealzellsuspension aus der Kultur mit hCG-FITC-Markierung, Fluoreszenz unter UV-Anregung (365 nm)

3.1.6 Progesteronproduktion in Abhängigkeit von Kulturmedium und Mediumsupplementen

Erhöhen der Pyruvatkonzentration

Lutealzellen wurden drei Tage nach Präparation in Multiwell-Kultur genommen (12 wells parallel, je 2 ml KV) und zunächst in Pyruvat-freiem MEM-E (Sigma) gehalten, welches mit 0,48 mM Na-Pyruvat supplementiert worden war. Nach 24 h beginnend wurden dann in Abständen von jeweils 48 h die Zellüberstände zur Progesteronbestimmung abgenommen und die Zellen nach zweifachem Waschen mit PBS erneut mit Medium versorgt. 96 h nach Aussaat waren die Zellen nach mikroskopischer Kontrolle zu einem konfluenten Layer ausgewachsen. 123,5 h nach Aussaat wurde für die Hälfte der Ansätze die hohe Pyruvat-Supplementierung ausgesetzt. Die Progesteronproduktionsrate pro Kultur liegt bei Anwesenheit von Pyruvat im Kulturmedium zwischen 110 und 240 fmol/d, nimmt nach Ausbleiben der Supplementierung über zwei Probenintervalle deutlich ab und pendelt sich auf einem niedrigeren Wert von 30 bis 80 fmol/d ein (Abb. 3.16).

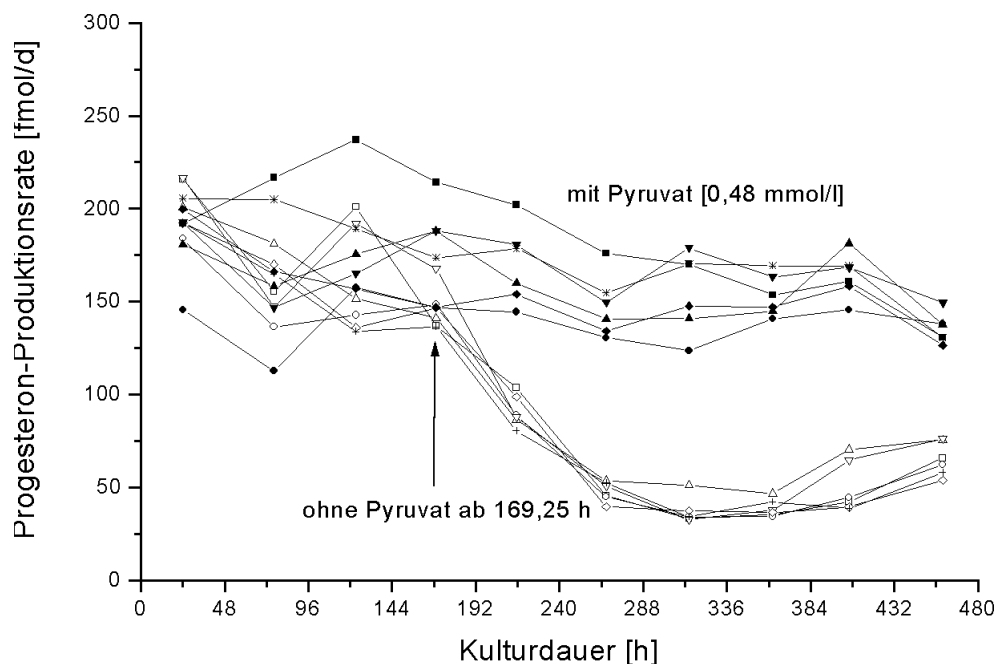


Abb. 3.16: Einfluß der Pyruvatsupplementierung auf die Progesteronproduktion
Zunächst wurden alle 12 Ansätze mit hohem Pyruvatgehalt etabliert. Nach 169,25 h wurde für 6 Ansätze die Pyruvatsupplementierung ausgesetzt. Die Progesteronproduktion sinkt deutlich ab.

Mediumwechsel

Lutealzellen wurden wiederum drei Tage nach Präparation in Multiwell-Kultur genommen und in MEM-E (Sigma) gehalten (6 wells parallel, je 2 ml KV). In Abständen von jeweils 24 h wurden die Zellüberstände zur Progesteronbestimmung abgenommen und die Zellen nach zweifachem Waschen mit PBS wieder mit neuem Medium versorgt. 72 h nach Aussaat wurde auf D-MEM (PAA) gewechselt, das einerseits Pyruvat (1 mM) enthält, einen höheren Gehalt an Glutamin von 4 mM gegenüber 2 mM des MEM-E vorweist und außerdem mit einem anderen fetalen Kälberserum (PAA) versehen war. Die basale Produktionsrate an Progesteron pro Kultur von 12 bis 23 pmol/d erhöhte sich über vier Probenintervalle auf Raten von 49 bis 57 pmol/d (Abb. 3.17).

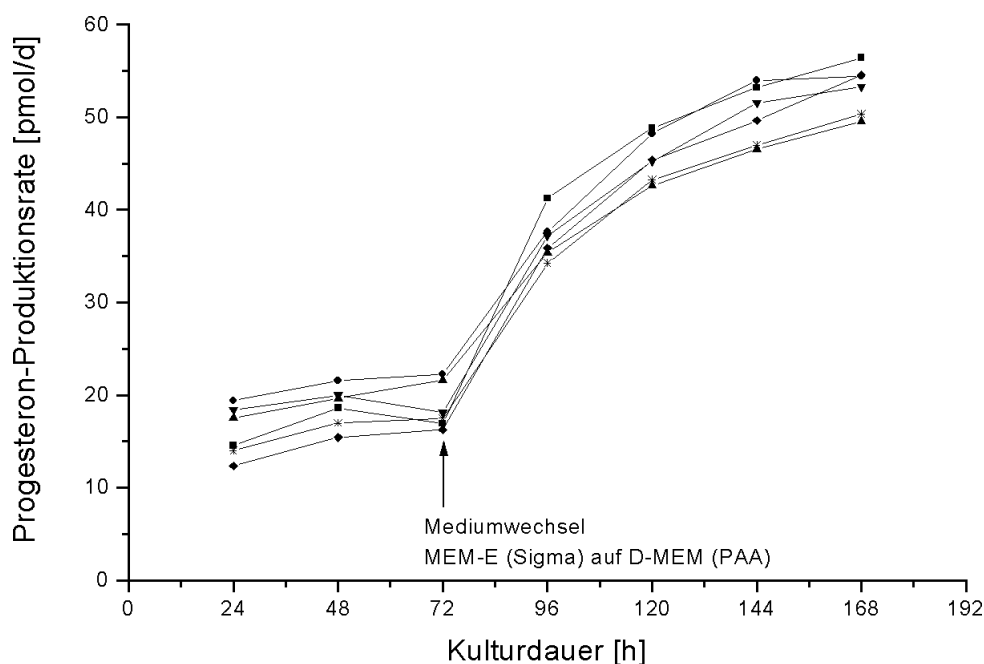


Abb. 3.17: Progesteronproduktion in Abhängigkeit des verwendeten Kulturmediums
Zunächst wurden sechs parallele Ansätze in MEM-E (Sigma) ankultiviert. Nach 72 Stunden wurde auf das Medium D-MEM (PAA) umgestellt. Bereits im ersten Probenintervall kam es zu einer Verdopplung der Produktionsraten in allen parallelen Ansätzen. Über alle nachfolgenden Intervalle waren weitere, wenn auch geringere Zunahmen zu beobachten.

Hormonelle Stimulation

Lutealzellen wurden drei Tage nach Präparation in T-Flaschen ausgesät und in MEM-E (Sigma) kultiviert, welches mit hCG (4,6 kU/l) supplementiert worden war (75 cm², 15 ml KV, 6 Ansätze). In Intervallen von 48 h wurden die Zellüberstände zur Progesteronbestimmung abgenommen und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS wieder mit neuem Medium versorgt. Nach 48 h wurde die Hälfte der Ansätze ohne Hormonzusatz kultiviert und die Änderung der Progesteronproduktionsrate verfolgt. Die Rate sinkt nach Entfernung des hCG von 79 bis 110 pmol/d bereits im ersten Probenintervall auf nahezu die Hälfte und pendelt sich in den folgenden Intervallen auf Raten von 32 bis 53 pmol/d ein (Abb. 3.18).

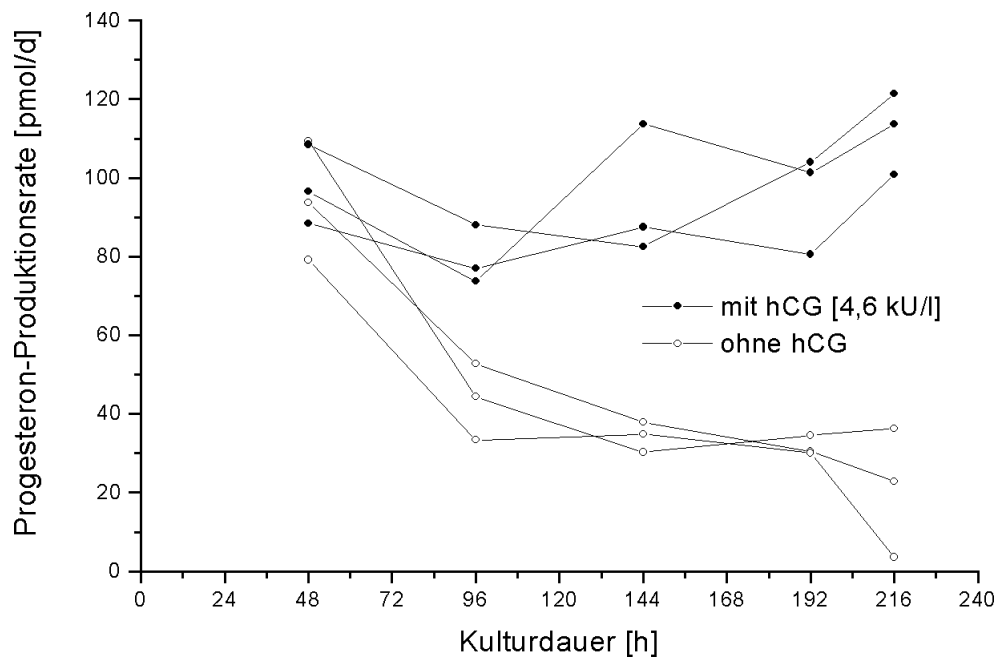


Abb. 3.18: Progesteronproduktion unter hormoneller Stimulation durch hCG

Zunächst wurden sechs parallele Ansätze unter hCG-Stimulation für 48 h ankultiviert. Für drei Ansätze wurde dann die hCG-Supplementierung von 4,6 kU/l weggelassen. Die Progesteronproduktion fällt innerhalb eines Probenintervalls deutlich ab.

3.1.7 Langzeitkultur

Lutealzellen wurden drei Tage nach Präparation in Multiwell-Kultur genommen und in D-MEM (PAA) kultiviert (4 wells parallel, je 2 ml KV). In Abständen von 7 Tagen wurden die Zellüberstände zur Progesteron- und Metabolitbestimmung abgenommen und die Zellen nach zweifachem Waschen mit PBS erneut mit Medium versorgt.

Erster Langzeittest (LZT-1: Laufzeit 77 Tage, 12 Probenintervalle, 4 Ansätze parallel):

Die Kultur startete im ersten Probenintervall mit sehr hohen Progesteronproduktionsraten von 268 bis 312 pmol/d, die aber bereits im zweiten Intervall auf fast ein Viertel abfielen und sich im vierten und fünften Intervall schließlich auf konstante Raten von 2 bis 5,9 pmol/d über die restliche Kulturdauer einpendelten (Abb. 3.19).

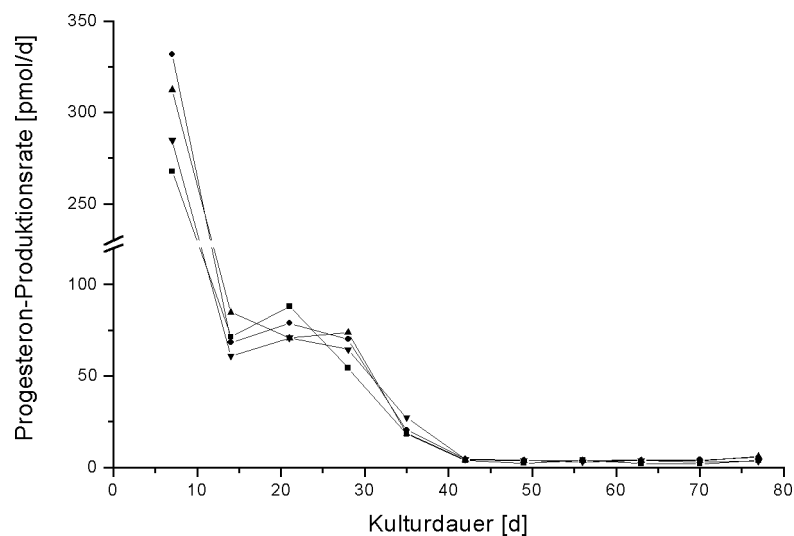


Abb. 3.19: Langzeitkultur von Lutealzellen in Multiwell-Platten (LZT-1)

In vier parallelen Ansätzen zu 2 ml Kulturvolumen wurden jeweils $1,5 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Nach sieben Tagen Intervall wurden die Kulturüberstände zur Progesteronbestimmung abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt.

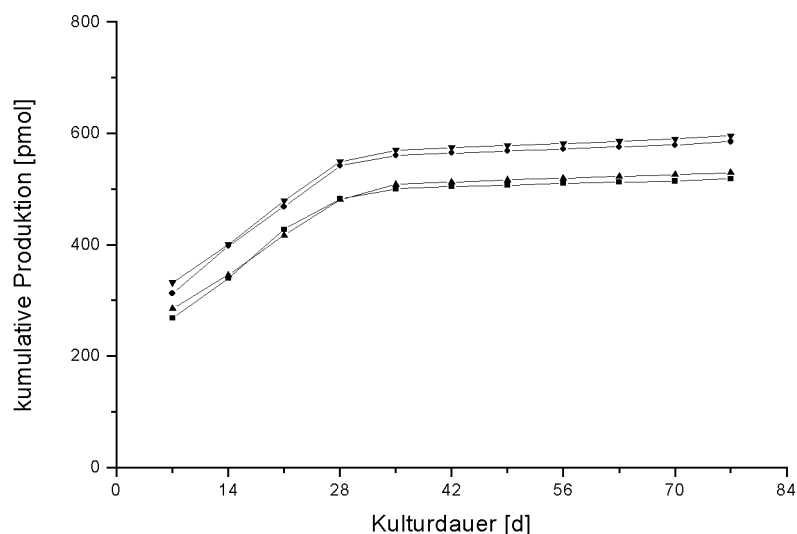


Abb. 3.20: Kumulative Produktion an Progesteron in der Langzeitkultur LZT-1

Die Auftragung der Summenproduktion zeigte dementsprechend über die ersten drei Intervalle die Hauptproduktion an Progesteron, zu der im weiteren Verlauf der Kulturdauer nur noch geringe Mengen dazu kommen (Abb. 3.20).

Zweiter Langzeittest (LZT-2: Laufzeit 98 Tage, 15 Probenintervalle, 4 Ansätze parallel):

Die Kultur zeigte über die ersten vier Probenintervalle eine konstante bis leicht zunehmende Progesteronproduktion von 62 bis 105 pmol/d, die dann bis zum Kulturende auf 36 bis 66 pmol/d mit gleichbleibender, geringer Neigung absinken (Abb. 3.21).

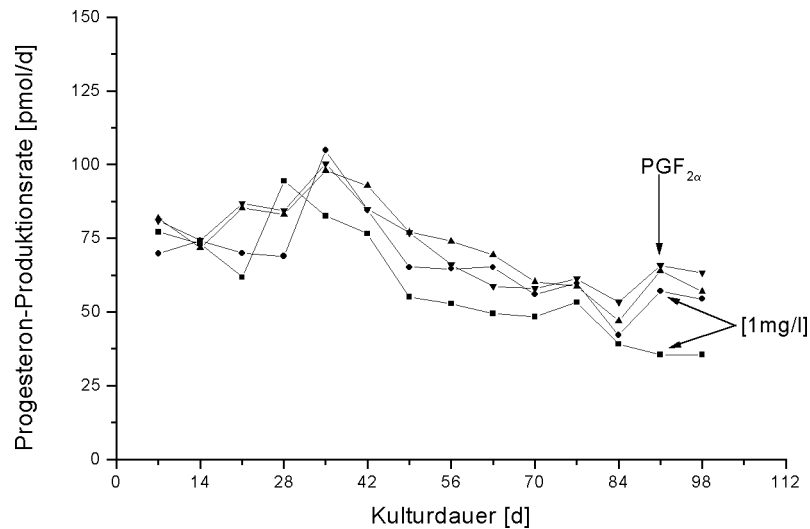


Abb. 3.21: Langzeitkultur von Lutealzellen in Multiwell-Platten (LZT-2)

In vier parallelen Ansätzen zu 2 ml Kulturvolumen wurden jeweils $1,5 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Nach sieben Tagen Intervall wurden der Kulturüberstand zur Progesteron-Bestimmung abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Zum Ende der Kultur Tag 91) wurde zwei Ansätzen das luteolytische $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einer Konzentration von 1 mg/l zugesetzt.

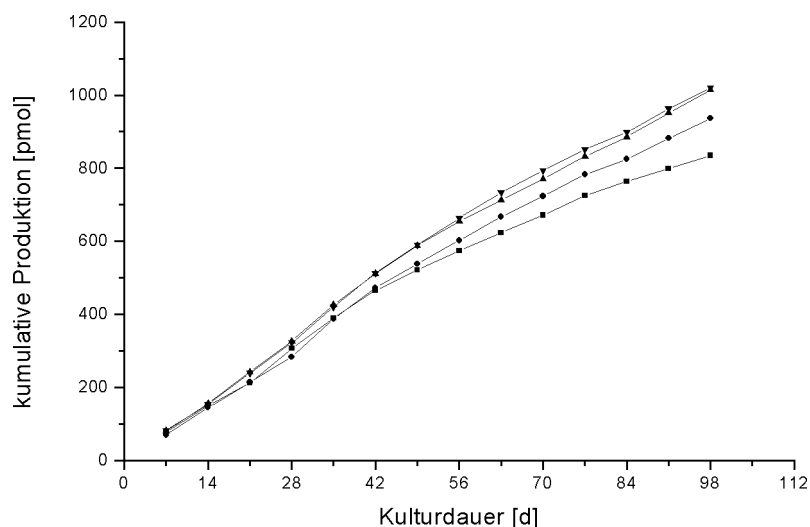


Abb. 3.22: Kumulative Produktion an Progesteron in der Langzeitkultur LZT-2

Die Zugabe des luteolytischen Prostaglandins $\text{PGF}_{2\alpha}$ nach Probennahme am Tag 98 der Kultur in den Ansätzen 3 und 4 zeigt keine Änderung des Produktionsverhaltens im letzten Intervall. Die Auftragung der Summenproduktion zeigt über den gesamten Verlauf eine deutliche Zunahme. Die Steigung bleibt bis zum 7. Probenintervall auf hohem Niveau konstant, flacht dann etwas ab und bleibt erneut auf einem bis zum Ende der Kultur nahezu gleichbleibenden, aber geringeren Wert erhalten (Abb. 3.22).

Dritter Langzeittest (LZT-3: 119 Tage, 17 Probenintervalle, 4 Ansätze parallel):

Die Kultur startete mit vergleichbar niedrigen Produktionsraten von 23 bis 36 pmol Progesteron pro Tag, die bis zum Kulturtag 91 in allen Ansätzen gleichmäßig auf 8 bis 11 pmol abfielen.

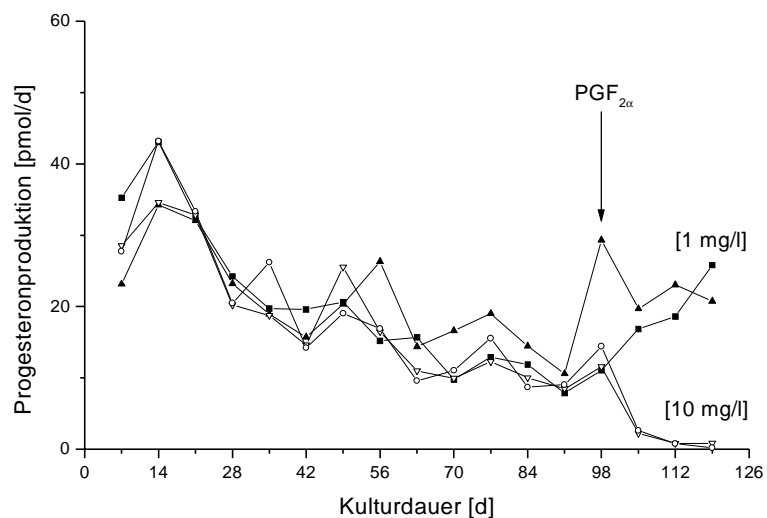


Abb. 3.23: Langzeitkultur von Lutealzellen in Multiwell-Platten (LZT-3)

In vier parallelen Ansätzen zu 2 ml Kulturvolumen wurden jeweils $1,5 \times 10^7$ Zellen eingesetzt. Nach sieben Tagen Intervall wurden der Kulturüberstand zur Progesteron-Bestimmung abgenommen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versorgt.

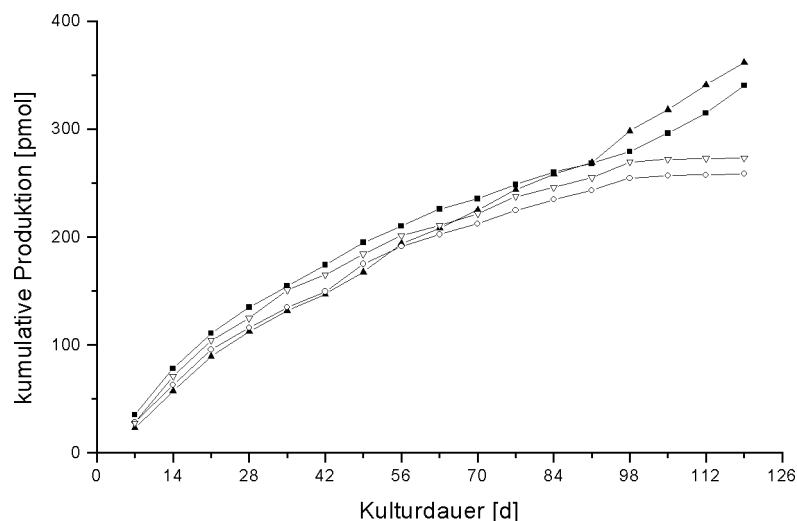


Abb. 3.24: Kumulative Produktion an Progesteron in der Langzeitkultur LZT-3

Nach 98 Tagen Kulturdauer wurde das luteolytische Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in Konzentrationen von 1 mg/l den Ansätzen 1 und 2 sowie von 10 mg/l den Ansätzen 3 und 4 zugegeben. Bereits innerhalb des folgenden Probenintervalls fiel die Produktion in den Ansätzen 3 und 4 deutlich ab. In den Ansätzen mit geringerer Prostaglandindosierung zeigte sich kein Rückgang der Produktionsrate; hier ist eher noch ein leichter Anstieg zu beobachten (Abb. 3.23). Auch hier zeigt die Auftragung der kumulativen Produktionen ein homogenes Verhalten in den parallelen Ansätzen. Über die gesamte Kulturdauer war kontinuierlich ein leichter Rückgang zu beobachten (Abb. 3.24).

3.2 Optimierung der Regelung für O₂ und pH im Bioreaktor

Die in der Prozeßkontrolle eingesetzten PI-Regelkreise für einen stabilen O₂-Gehalt und pH-Wert im Kulturvolumen wurden hinsichtlich ihrer Regelparameter optimiert. So war eine zügige Korrektur der Abweichungen von den Sollwerten gewährleistet, ohne dabei das System in Schwingung zu versetzen.

Dazu wurden Änderungen der Regelgrößen durch Ausgasung von O₂ und CO₂ mit N₂ erzeugt und die Dynamik der Regelung aufgezeichnet (Abb.3.25). Durch Variation der Wichtungsfaktoren k_p für das Proportionalelement und k_i für das Integralelement konnte

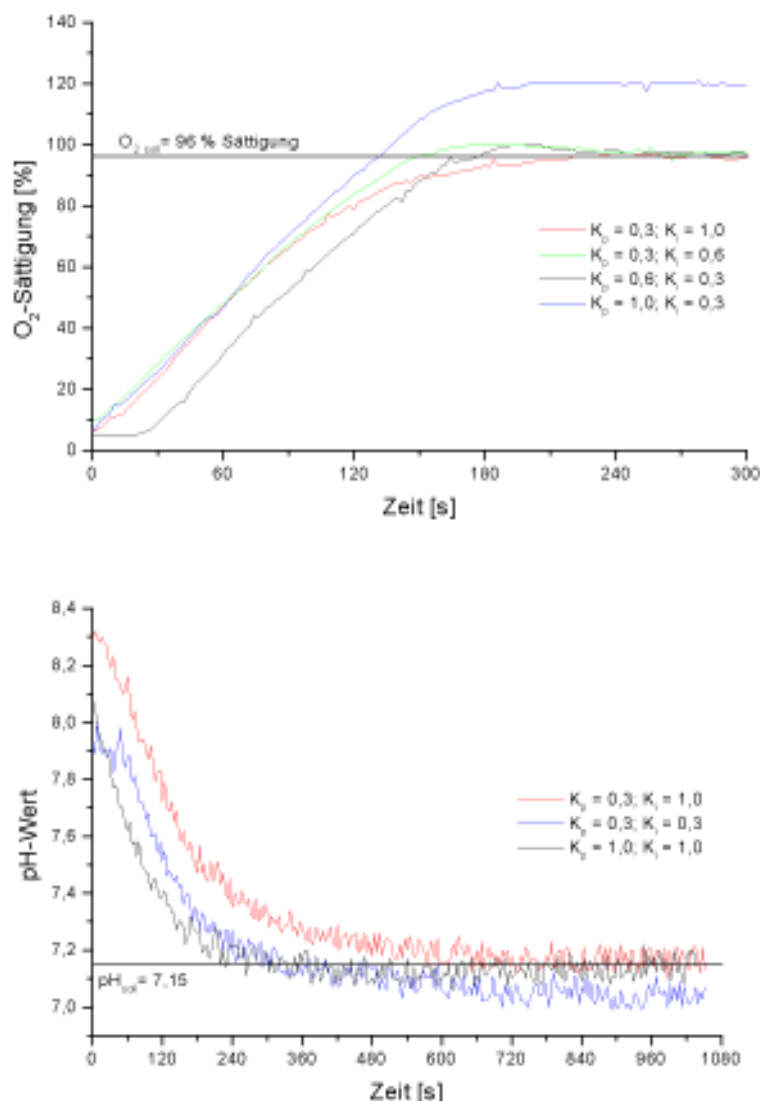


Abb. 3.25: Dynamik der Sprungantworten des O₂ (oben) und des pH-Regelsystems (unten) anhand einer Auswahl von Wichtungskombinationen zwischen dem Proportional- und dem Integralteil

Die Störung im Kulturvolumen wurde konstanten Eintrag von Stickstoff erzeugt. Bei einer zu hohen Gewichtung der proportionalen gegenüber den integralen Eigenschaften kommt es zu einem Überschießen der O₂- und pH-Wert Regelung über, bzw. unter den Sollwert und einem gedämpften Nachschwingen (nicht abgebildet). Bei zu geringer Proportionalregelung erfolgt die Annäherung an den Sollwert zu langsam.

empirisch die optimale Reaktion der Regler ermittelt werden: 0,3 für k_p sowie 1 für k_i . Diese Werte wurden in allen durchgeführten Reaktorläufen verwendet. Beide Regler sind somit auf Führung optimiert worden (RAAB, 1988). Für die Kultur wurde ein Sauerstoffgehalt von 120 % des Sättigungswertes gewählt, was bei 36,5 °C Temperatur des Kultursystems einer Konzentration von 6,78 mg/l physikalisch gelöstem O₂ entspricht. Die Regelung gewährleistete einen stabilen Sauerstoffgehalt in den Kulturmodulen mit einer Schwankungsbreite von 5 % des Sättigungswertes (Sollwert). Für die pH-Wert-Regelung wurde der Sollwert auf pH=7,2 eingestellt, der mit einer Schwankungsbreite von 0,1 pH-Einheiten im Kulturmodul stabil eingeregelt werden konnte.

3.3 Kontinuierliche Kultur im Bioreaktor

3.3.1 Kontinuierliche Kultur im Hohlfasermodul

Für jeden Reaktorlauf mit Hohlfasermodul wurde jeweils auf eine neue Lutealgewebepreparation zurückgegriffen. Die Zellen wurden drei Tage nach Präparation in neue T-Flaschen (75 cm², 15 ml KV) umgesetzt und in D-MEM vorkultiviert. In drei Passagen konnten die Zellen auf acht konfluente T-Flaschen mit 600 cm² und 120 ml Kulturvolumen ausgedehnt werden. Die Zellmasse wurde in die 12 ml EKV des Moduls eingebracht und bei insgesamt 92 ml Gesamtvolumen kultiviert.

Nach 24 h wurde der Kulturraum im Reaktor gespült, nicht anhaftende Zellen entfernt und der Reaktor unmittelbar im kontinuierlichen Betrieb gefahren. Es wurden Verdünnungsraten von 1/d und 2/d eingesetzt. Die für die Progesteronbestimmung entnommenen Proben wurden für den Lauf HF-6 mit der niedrigsten Verdünnungsrate von $D = 1/d$ auf ihren Gehalt an Glucose und Lactat untersucht. Es konnte durchgehend ein Glucosegehalt von mindestens 5 mM gewährleistet werden. Die Lactatkonzentration stieg nicht über 1,48 mM an (Abb. 3.26).

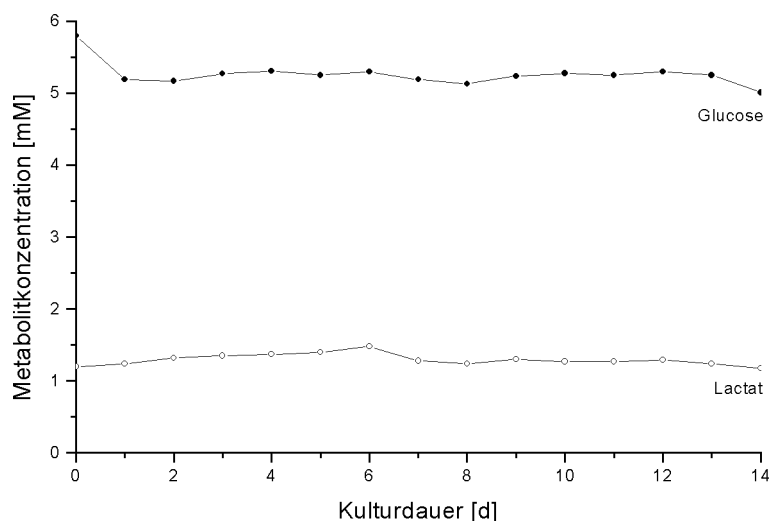


Abb. 3.26: Verlauf der Konzentrationen an Glucose und Lactat
Reaktorläufe mit Hohlfasermodul; niedrigste Verdünnungsrate von $D = 1/d$

In allen sechs ohne Kontamination erfolgreich durchgeführten Kulturläufen konnte über die gesamte Dauer von 360 - 514 Stunden die Produktion von Progesteron nachgewiesen werden (Abb. 3.27 - 3.29).

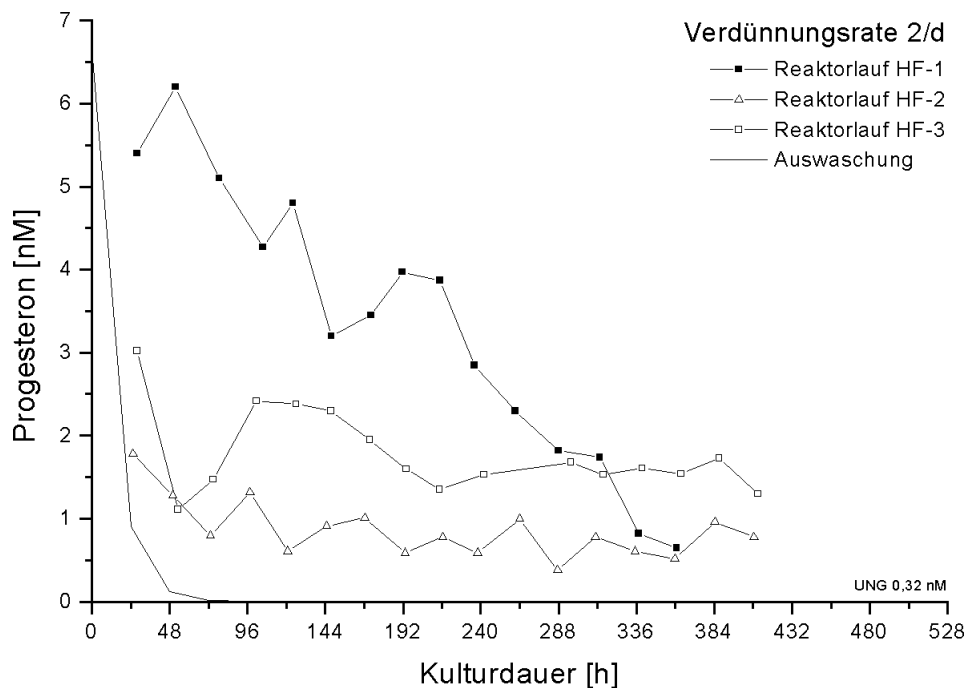


Abb. 3.27: Verlauf der Progesteronkonzentration für drei Reaktorläufe mit Hohlfaserm modul und Verdünnungsrate von $D = 2/d$

Es wurde für jeden Lauf auf eine neue Lutealzellpräparation zurückgegriffen und im kontinuierlichen Betrieb gestartet. Der exponentielle Abfall (Kurvenverlauf ohne Markierung) gibt zum Vergleich die Auswaschung durch die gewählte Verdünnungsrate wieder.

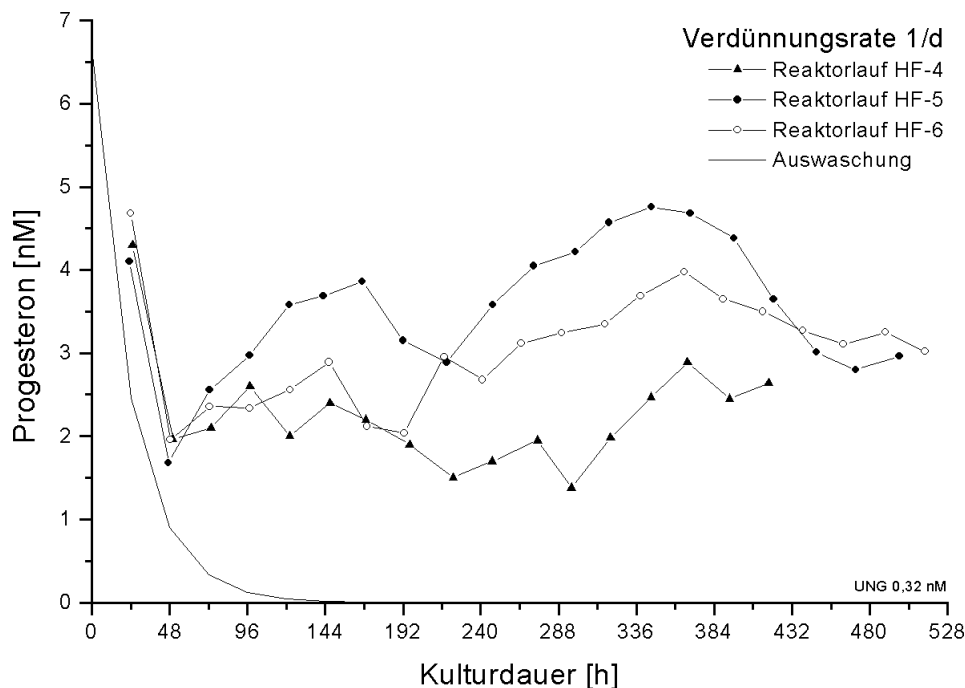


Abb. 3.28: Verlauf der Progesteronkonzentration für drei Reaktorläufe mit Hohlfaserm modul und Verdünnungsrate von $D = 1/d$

Es wurde für jeden Lauf auf eine neue Lutealzellpräparation zurückgegriffen und im kontinuierlichen Betrieb gestartet. Der exponentielle Abfall (Kurvenverlauf ohne Markierung) gibt die Auswaschung durch die gewählte Verdünnungsrate wieder.

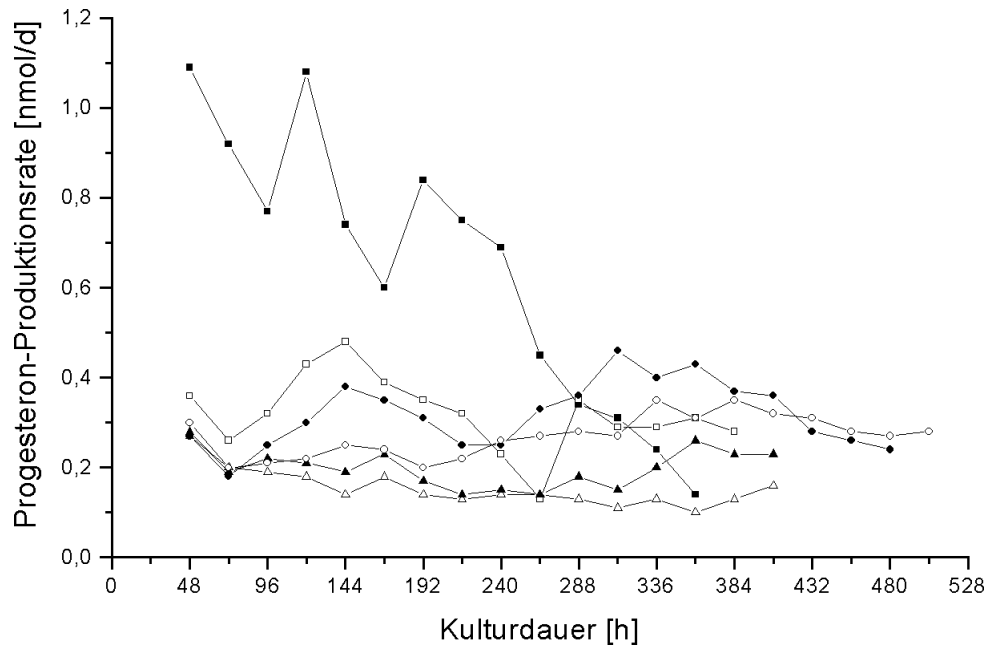


Abb. 3.29: Verlauf der Progesteronproduktion für alle Reaktorläufe mit Hohlfasermodul unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsraten

Die gemessenen Konzentrationen an Progesteron über die Kulturdauer der einzelnen Reaktorläufe lagen im Mittel zwischen 0,9 und 3,6 nM. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsraten ergaben sich mittlere Produktionsraten zwischen 0,14 und 0,64 nmol pro Tag. Die Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die mittleren Konzentrationen und Produktionsraten der einzelnen Reaktorläufe.

Tab. 3.3: Übersicht über alle durchgeführten Reaktorläufe mit Hohlfasermodul mit mittleren Konzentrationen an Progesteron im Kulturmedium und den resultierenden Produktionsraten und Standardabweichungen (s)

HF-Lauf	mittlere Progesteron-Konzentration [nM]		mittlere Progesteron-Produktion [nmol/d]	
	\bar{x}	+/- s	\bar{x}	+/- s
1	3,36	+/- 1,67	0,64	+/- 0,30
2	0,86	+/- 0,35	0,15	+/- 0,04
3	1,78	+/- 0,50	0,32	+/- 0,08
4	2,26	+/- 0,66	0,20	+/- 0,04
5	3,56	+/- 0,80	0,32	+/- 0,07
6	3,04	+/- 0,68	0,27	+/- 0,05

Mit Ausnahme des Reaktorlaufs HF-1 zeigte sich eine über die Kulturdauer stabile bis leicht steigende Progesteronkonzentration im Kulturmedium. HF-1 zeigte tendenziell einen Rückgang der Produktion über die gesamte Kulturdauer. Er startete mit sehr hoher Produktion von über 1 nmol/d und fiel bis zum Ende der Kultur auf einen sehr niedrigen Wert von 0,14 nmol/d und damit auf etwa 1/10 der Ausgangsproduktion ab.

Läßt man diesen Lauf außer Acht, so wurden im Hohlfasersystem durchgehend im Mittel 0,25 nmol Progesteron pro Tag produziert. Die geringere Verdünnungsrate von $D = 1/d$ ermöglicht höhere Produktionsraten als eine Verdünnungsrate von $D = 2/d$.

Die Darstellung der kumulativen Produktionen veranschaulicht durch die fortlaufenden Steigungen die Produktionleistungen der Lutealzellen über die gesamte Kulturdauer im kontinuierlichen Hohlfaser-Bioreaktor sehr gut (Abb. 3.30). Über die gesamte Kulturdauer der HF-Läufe 2 bis 6 gemittelt produzierten die Lutealzellen zwischen 6 und 12,5 pmol Progesteron pro Stunde, in Lauf HF-1 sogar 24 pmol. Bezieht man die Produktionsraten auf die Zellzahl zum Reaktorstart von jeweils 2×10^9 Zellen und läßt eine Proliferation der Zellen während des Reaktorlaufs außer Acht, so produziert jede Lutealzelle 3 bis 6×10^{-21} mol Progesteron pro Stunde, also etwa 100 Moleküle Progesteron/h.

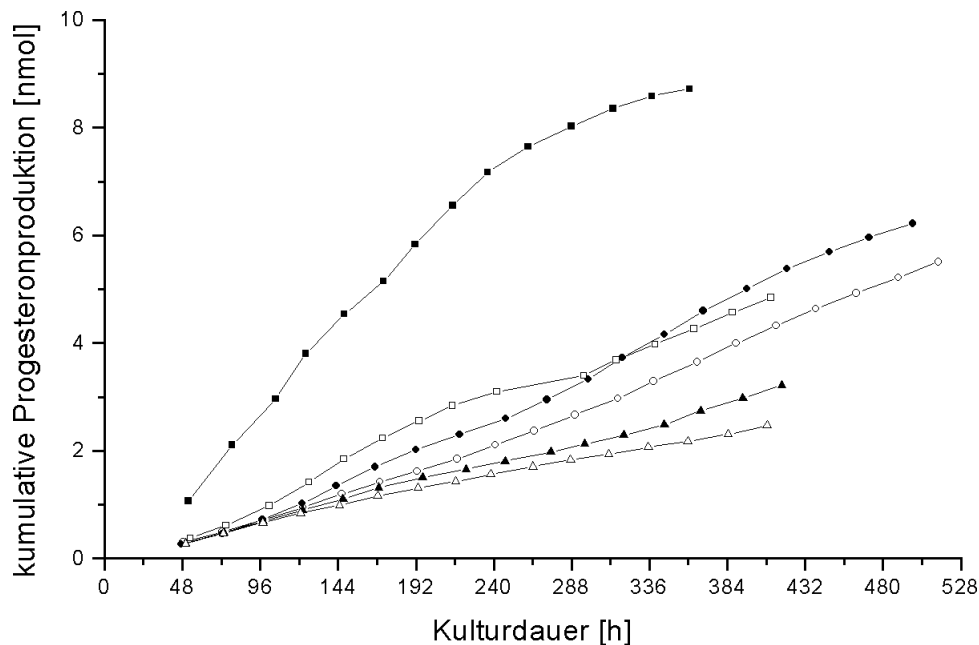


Abb. 3.30: Auftragung der kumulativen Produktionsraten aller Reaktorläufe im Hohlfasersystem

3.3.2 Kontinuierliche Kultur im Wirbelschichtmodul

Aufgrund der erfolgreichen Kryokonservierung konnte für alle Wirbelschicht-Reaktorläufe auf die gleiche Gewebepreparation zurückgegriffen werden. Kryokonservierte Lutealzellen wurden nach dem Auftauen für die Kultur vorbereitet und in T-Flaschen (80 cm², 15 ml KV) vorkultiviert. In drei bzw. vier Passagen konnten die Zellen auf 8 bis 16 konfluente T-Flaschen mit 640 bis 1280 cm² und 120 bis 240 ml Kulturvolumen ausgedehnt werden. Die Zellmasse von acht bzw. zwölf Kulturflaschen wurde mit den vorbereiteten Cytodex 3 Gelpartikeln für 24 h inkuliert (Abb. 3.31). Anschließend wurde die Suspension in das Modul eingespült und in insgesamt 90 ml Reaktorvolumen kultiviert.

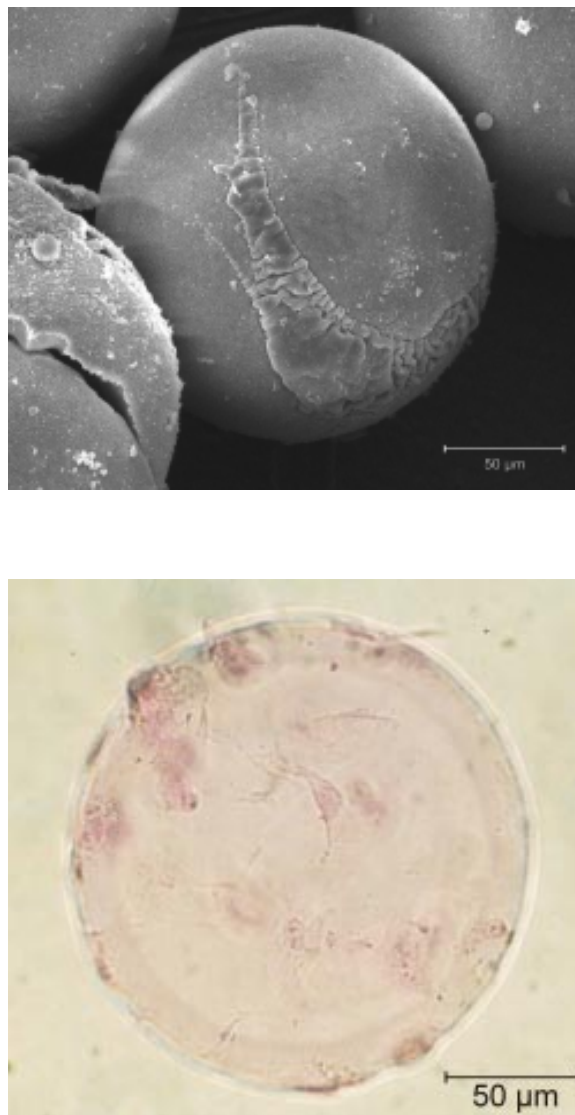


Abb. 3.31: Adhärenz wachsende Lutealzellen auf Cytodex 3 Microcarriern nach 24 h Inokulation vor Beginn des Reaktorstarts

oben: Gelpartikel mit einer einzelnen Lutealzelle (REM Aufnahme; durch die Trocknung des Präparates kommt es zu einer leichten Schrumpfung der Gelpartikel)
 unten: Gelpartikel mit mehreren Lutealzellen (Kernfärbung mit Kernechtrot; Phasenkontrast)

Für die Reaktorläufe WS-1 und WS-2 wurden 8 konfluente Kulturflaschen eingesetzt. Dies entspricht, verglichen mit den Zelldichten in kleinen T-Flaschen, etwa 2×10^9 Zellen pro Lauf. Es wurden 100 mg Cytodex 3 für die Inokulation verwendet. Die Kulturen wurden direkt im kontinuierlichen Betrieb mit Verdünnungsraten von $D = 1/d$ und $D = 0,5/d$ gestartet. Für die Reaktorläufe WS-3 und WS-4 konnten Zellen von 12 konfluente Kulturflaschen bereitgestellt werden. Es wurden somit jeweils etwa 3×10^9 Zellen und 150 mg Cytodex 3 zur Inokulation und zur Kultur im Bioreaktor eingesetzt. Die Läufe WS-3 und WS-4 wurden im Gegensatz zu den vorangegangenen Reaktorläufen zunächst für 72 h im batch-Verfahren gestartet und dann auf kontinuierlichen Betrieb mit Verdünnungsraten von $D = 0,33/d$ umgeschaltet.

Auch bei diesen sehr niedrigen Verdünnungsraten konnte ein Glucosegehalt von mindestens 5 mM gewährleistet werden. Die Lactatkonzentration stieg nicht über 0,74 mM an (Abb. 3.32).

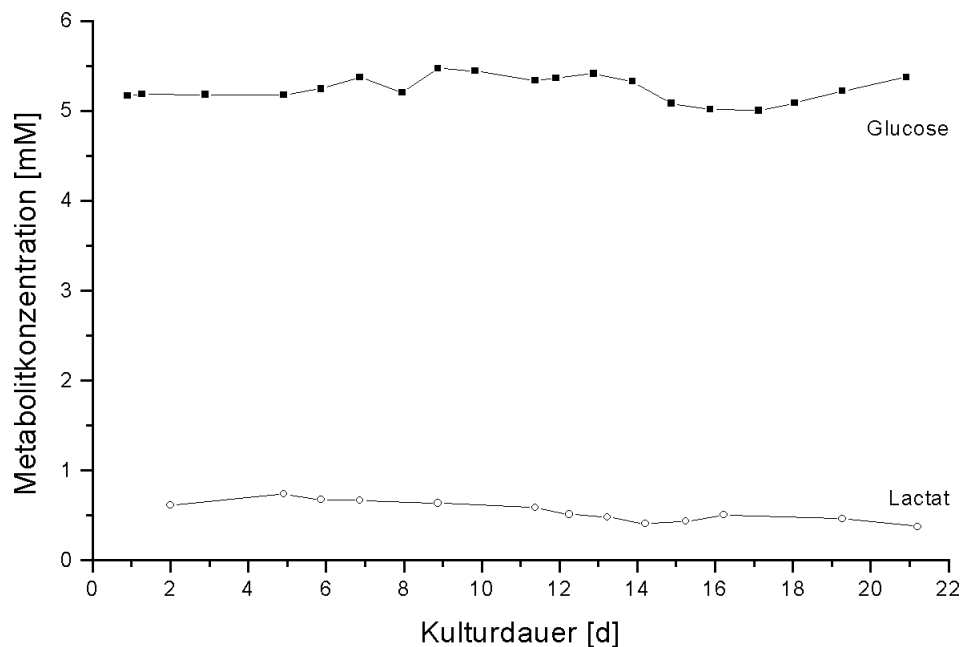


Abb. 3.32: Verlauf der Konzentrationen an Glucose und Lactat
Reaktorläufe mit Wirbelschichtmodul; niedrigste Verdünnungsrate von $D = 0,33/d$

Untersuchung des luteolytischen Effekts von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im kontinuierlichen Reaktorbetrieb

In den Reaktorläufen WS-3 und WS-4 wurde nach längerem kontinuierlichen Betrieb außerdem der inhibitorische Effekt des luteolytisch wirksamen Prostaglandins $\text{F}_{2\alpha}$ getestet. Nach 325 Stunden Kulturdauer von Lauf WS-3 wurde die Lutealzellpopulation im Reaktorvolumen einer Konzentration von 1 mg/l $\text{PGF}_{2\alpha}$ ausgesetzt. Es wurde dazu in das Kulturvolumen direkt eine entsprechende Menge des Prostaglandins injiziert und weiterhin über die kontinuierliche Mediumzufuhr der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Spiegel bis zum Kulturende aufrechterhalten. In Lauf WS-4 wurden die Zellen nach 222 Stunden Kulturdauer einer konstanten Konzentration von 10 mg/l $\text{PGF}_{2\alpha}$ bis zum Ende des Reaktorbetriebs ausgesetzt.

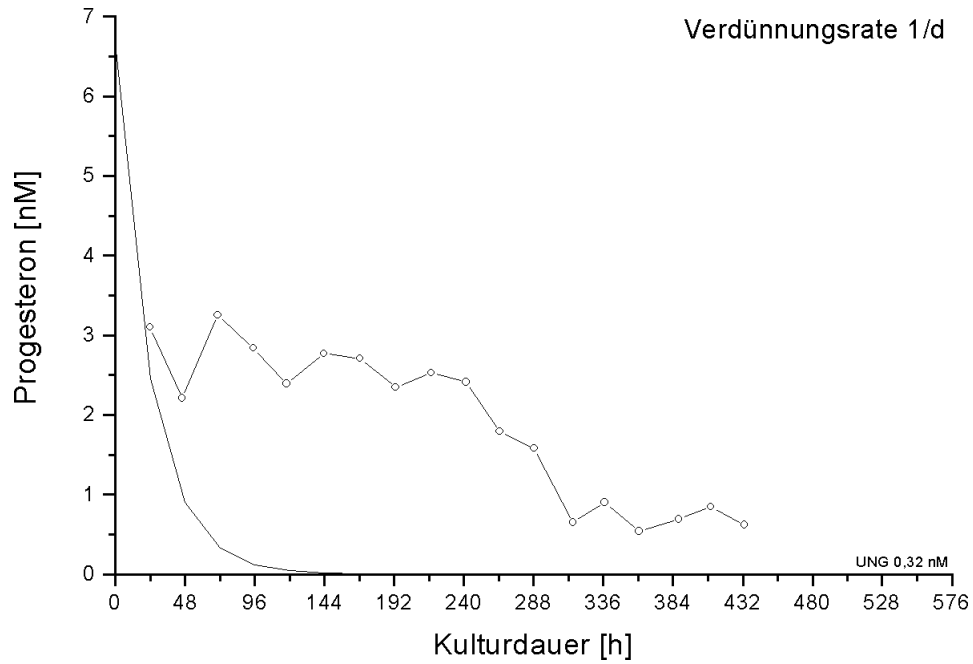


Abb. 3.33: Verlauf der Progesteronkonzentration für den Reaktorlauf WS-1 mit Wirbelschichtmodul und Verdünnungsrate $D = 1/d$
 Der exponentielle Abfall (Kurvenverlauf ohne Markierung) gibt die Auswaschung durch die gewählte Verdünnungsrate wieder.
 Es wurden zum Reaktorstart 2×10^9 Zellen eingesetzt.

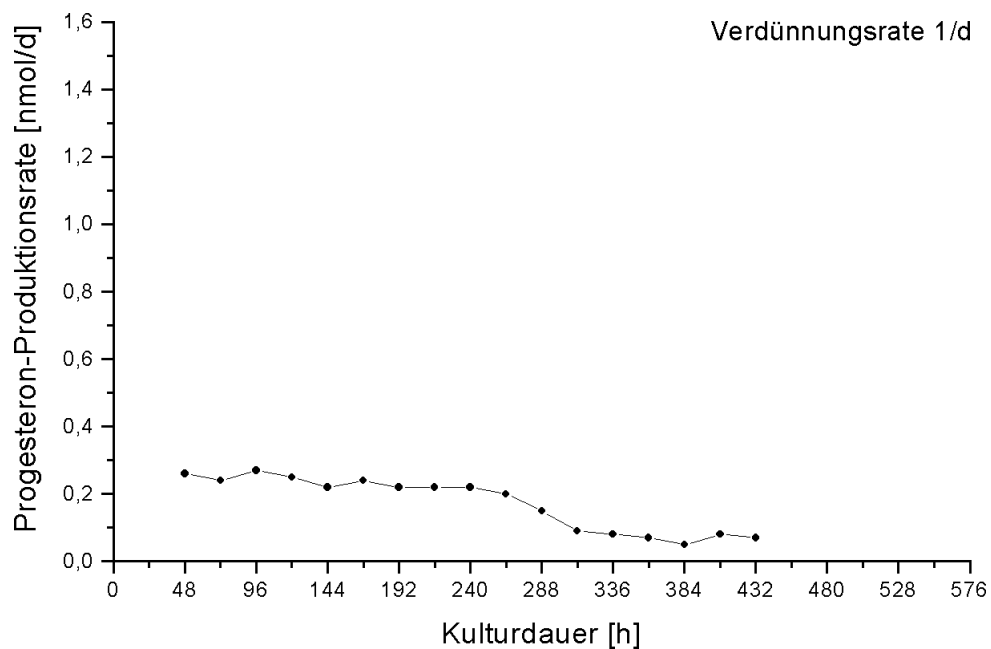


Abb. 3.34: Verlauf der Progesteronproduktion für den Reaktorlauf WS-1 (Wirbelschichtmodul)

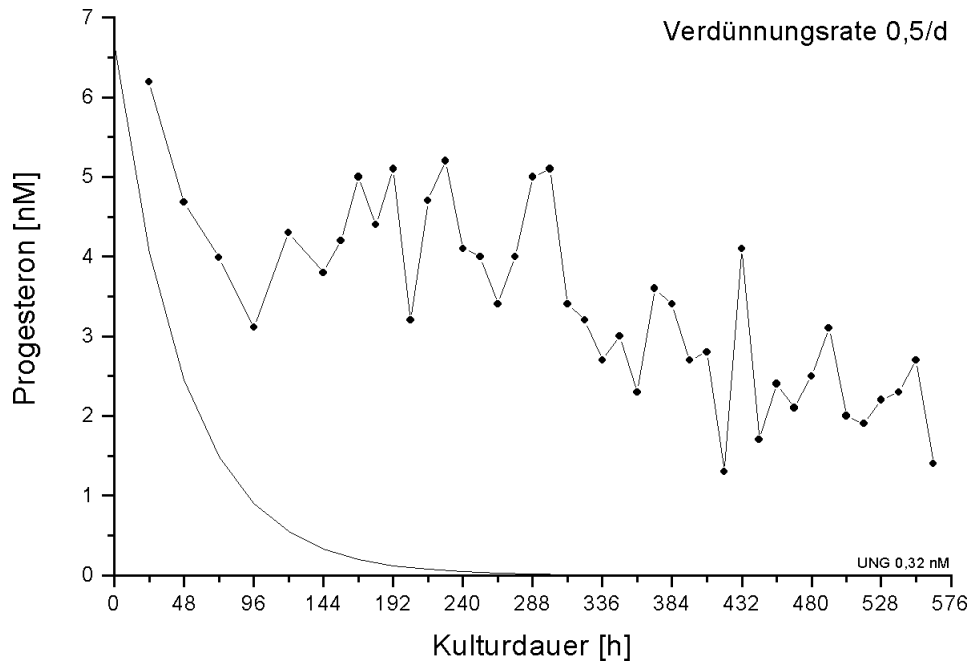


Abb. 3.35: Verlauf der Progesteronkonzentration für den Reaktorlauf WS-2 mit Wirbelschichtmodul und Verdünnungsrate $D = 1/d$

Der exponentielle Abfall (Kursenverlauf ohne Markierung) gibt die Auswaschung bedingt durch die gewählte Verdünnungsrate wieder. Es wurden zum Reaktorstart 2×10^9 Zellen eingesetzt.

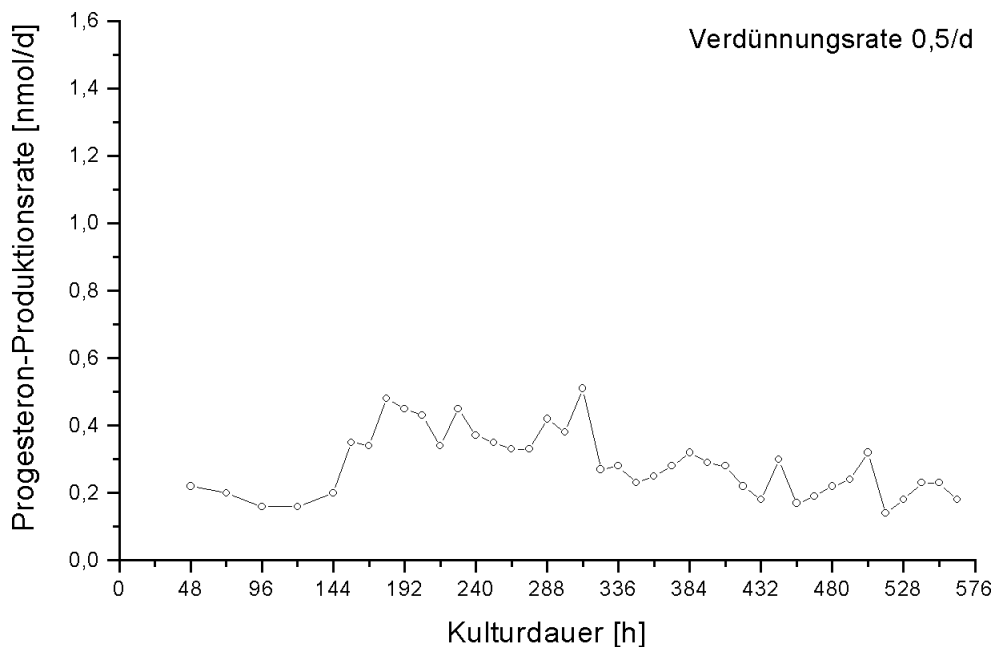


Abb. 3.36: Verlauf der Progesteronproduktionsraten für den Reaktorlauf WS-2 (Wirbelschichtmodul)

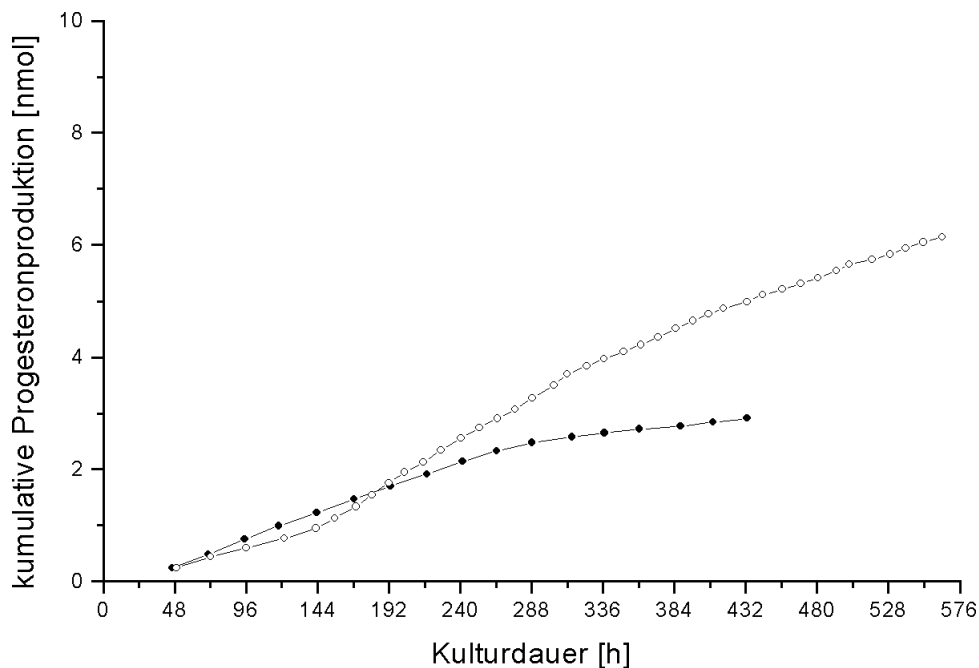


Abb. 3.37: Kumulative Progesteronproduktionen der Reaktorläufe WS-1 und WS-2

In allen durchgeführten Kulturexperimenten im kontinuierlichen Wirbelschichtbetrieb konnte über die gesamte Kulturdauer bzw. bis zur Gabe des $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine hohe Produktion ermittelt werden. Die Produktionsraten waren unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Startzell-dichten uneinheitlich und zeigten über die jeweilige Kulturdauer zum Teil erhebliche Schwankungen (Tab. 3.4), obwohl auf die gleiche kryokonservierte Gewebepreparation zurückgegriffen werden konnte.

Für die Läufe WS-1 und WS-2 betrugen die Produktionsraten im Mittel 0,23 nmol Progesteron pro Tag (Abb. 3.33 - 3.36). Ihr Verlauf über die Kulturdauer ist relativ konstant. Die niedrige Verdünnungsrate von $D = 0,5/\text{d}$ in Lauf WS-2 erbrachte mit 0,29 mmol/d eine deutliche Erhöhung der Produktion gegenüber 0,17 mmol/d bei $D = 1/\text{d}$ in Lauf WS-1.

Die Reaktorläufe WS-3 und WS-4 zeigten aufgrund der erhöhten Startzell-dichte und der sehr geringen Verdünnungsrate von $D = 0,33/\text{d}$ sehr hohe Produktionsraten. Im Reaktorlauf WS-3 wurde bis zur Gabe des luteolytischen Prostaglandins $\text{F}_{2\alpha}$ im kontinuierlichen Betrieb 0,92 nmol ($\pm 0,31$ nmol/d) Progesteron pro Tag produziert. Anschließend zeigte sich nur eine geringe Abnahme auf 0,53 nmol/d (Mittelwert; $s = \pm 0,22$ nmol/d) (Abb. 3.39).

Der Reaktorlauf WS-4 erbrachte zunächst eine mittlere Progesteronproduktionsrate von 1,66 nmol/d ($\pm 0,73$ nmol/d), die nach Zugabe des Prostaglandins zum Ende der Kultur mit einer Konzentration von 10 mg/l auf niedrige Werte von 0,7 nmol pro Tag absank (Abb. 3.40, 3.41).

Die Darstellung der kumulativen Produktion veranschaulicht hier durch die fortlaufenden Steigungen die Produktionleistungen der Lutealzellen über die gesamte Kulturdauer im kontinuierlichen Wirbelschicht-Bioreaktor sehr gut (Abb. 3.37, 3.42).

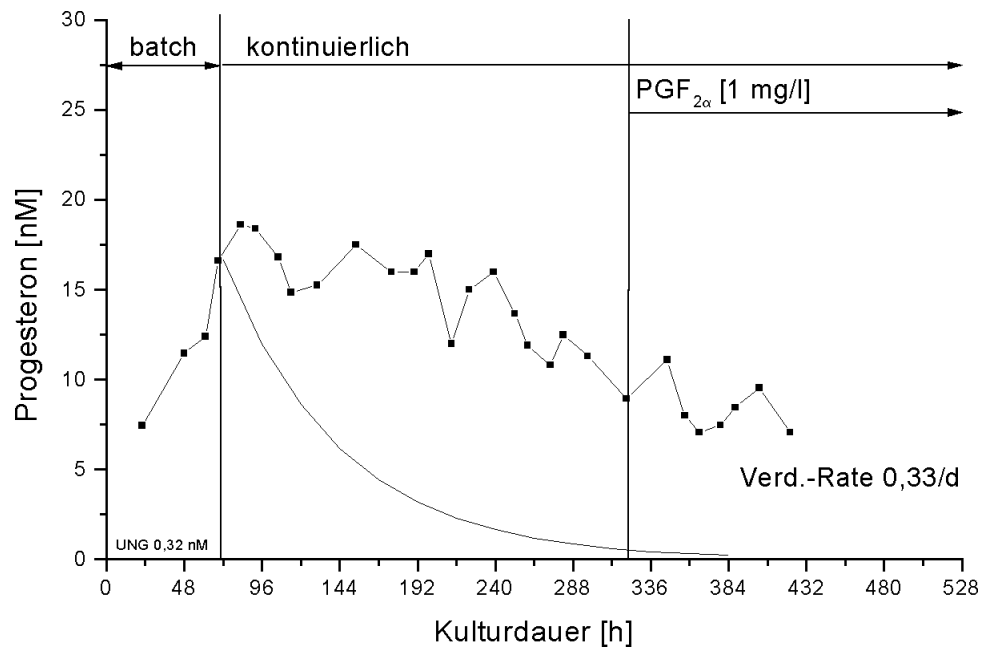


Abb. 3.38: Verlauf der Progesteronkonzentration für den Reaktorlauf WS-3

Zunächst wurde die Kultur im batch-Betrieb gestartet. Nach 72 h wurde auf kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,33/d$ umgeschaltet. Es wurden zum Reaktorstart 3×10^9 Zellen eingesetzt. Der exponentielle Abfall (Kurvenverlauf ohne Markierung) gibt die Auswaschung durch die gewählte Verdünnungsrate wieder. Nach 325 h Kulturdauer wurden die Zellen bis zum Ende der Kultur einer konstanten Konzentration an Prostaglandin $F_{2\alpha}$ von 1 mg/l ausgesetzt. Dazu wurde direkt eine entsprechende Menge $PGF_{2\alpha}$ in das Kulturvolumen und den Mediumvorlauf gegeben.

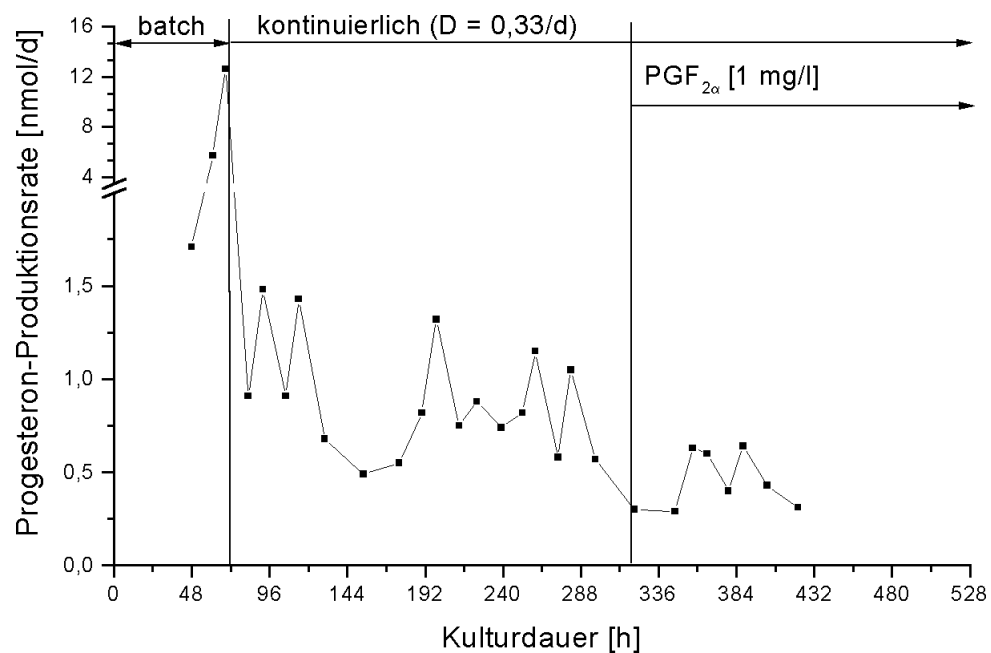


Abb. 3.39: Verlauf der Progesteronproduktionsrate für den Reaktorlauf WS-3 (Wirbelschichtmodul)

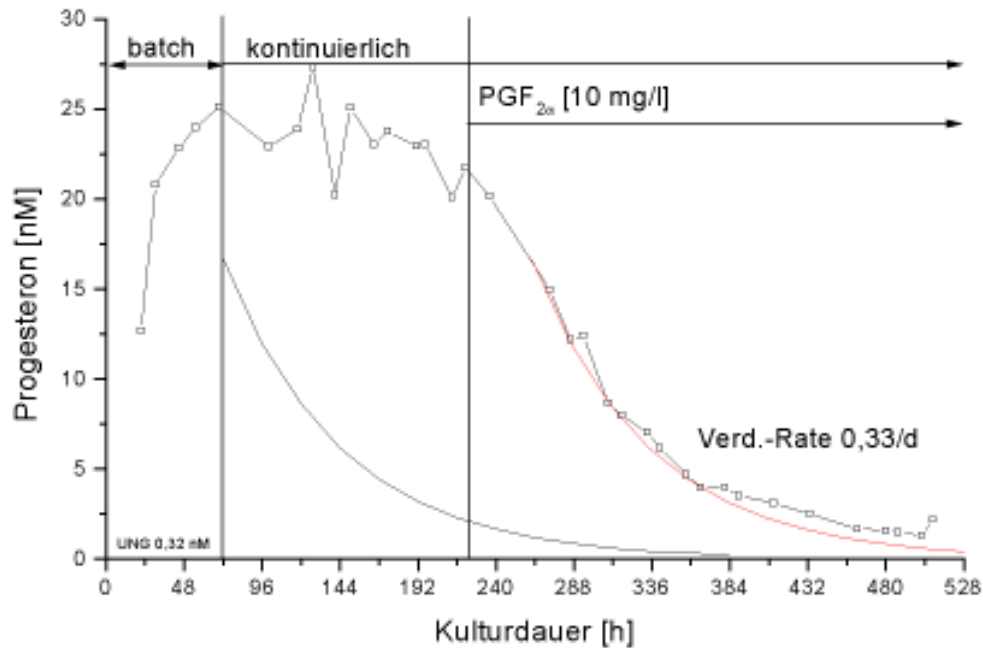


Abb. 3.40: Verlauf der Progesteronkonzentration für den Reaktorlauf WS-4

Zunächst wurde die Kultur im batch-Betrieb gestartet. Nach 72 h wurde auf kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate von $D = 0,33/d$ umgeschaltet. Es wurden zum Reaktorstart 3×10^9 Zellen eingesetzt. Der exponentielle Abfall (Kurvenverlauf ohne Markierung, schwarz und rot) gibt die Auswaschung durch die gewählte Verdünnungsrate wieder. Nach 222 h Kulturdauer wurden die Zellen bis zum Ende der Kultur einer konstanten Konzentration an Prostaglandin $F_{2\alpha}$ von 10 mg/l ausgesetzt. Dazu wurde direkt eine entsprechende Menge $PGF_{2\alpha}$ in das Kulturvolumen und den Mediumvorlauf gegeben.

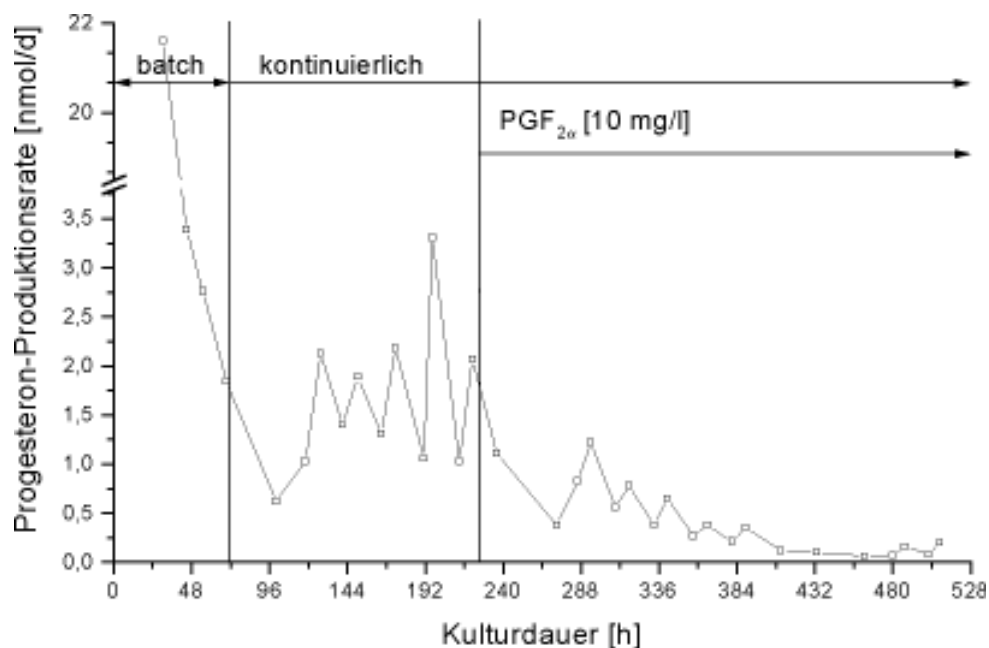


Abb. 3.41: Verlauf der Progesteronproduktionsrate des Reaktorlaufs WS-4 (Wirbelschichtmodul)

Über die gesamte Kulturdauer der vier WS-Läufe produzierten die Lutealzellen zwischen 5 und 45 pmol Progesteron pro Stunde, ohne Einfluß des $\text{PGF}_{2\alpha}$. Der Kurvenverlauf flacht nach Zugabe des Prostaglandins deutlich ab und es verbleibt nur noch eine sehr geringe Steigung und damit geringe Produktion an Progesteron.

Läßt man auch hier eine Proliferation der Zellen während des Reaktorlaufs außer Acht und bezieht die Raten auf die eingesetzte Startzellzahl von von 2×10^9 Zellen bzw. 3×10^9 Zellen, so ergeben sich daraus Progesteronproduktionsraten von $1,7 \times 10^{-21}$ bis $1,5 \times 10^{-20}$ mol/h pro Zelle, also 350 bis 4000 Moleküle pro Lutealzelle und Stunde.

Tab. 3.3: Übersicht über alle durchgeführten Reaktorläufe mit Wirbelschichtmodul
Mittlere Konzentrationen an Progesteron im Kulturmedium und resultierende Produktionsraten mit Standardabweichungen

WS-Lauf	mittlere Progesteron-Konzentration [nM]		mittlere Progesteron-Produktion [nmol/d]	
	\bar{x}	+/- s	\bar{x}	+/- s
1	1,90	+/- 0,95	0,17	+/- 0,08
2	3,42	+/- 1,17	0,29	+/- 0,10
3 (72-325 h)	15,64	+/- 2,07	0,92	+/- 0,31
3 (325-422 h)	9,30	+/- 1,89	0,53	+/- 0,22
4 (72-222 h)	23,27	+/- 2,04	1,66	+/- 0,73
4 (222-509 h)	6,30	+/- 5,29	0,42	+/- 0,35

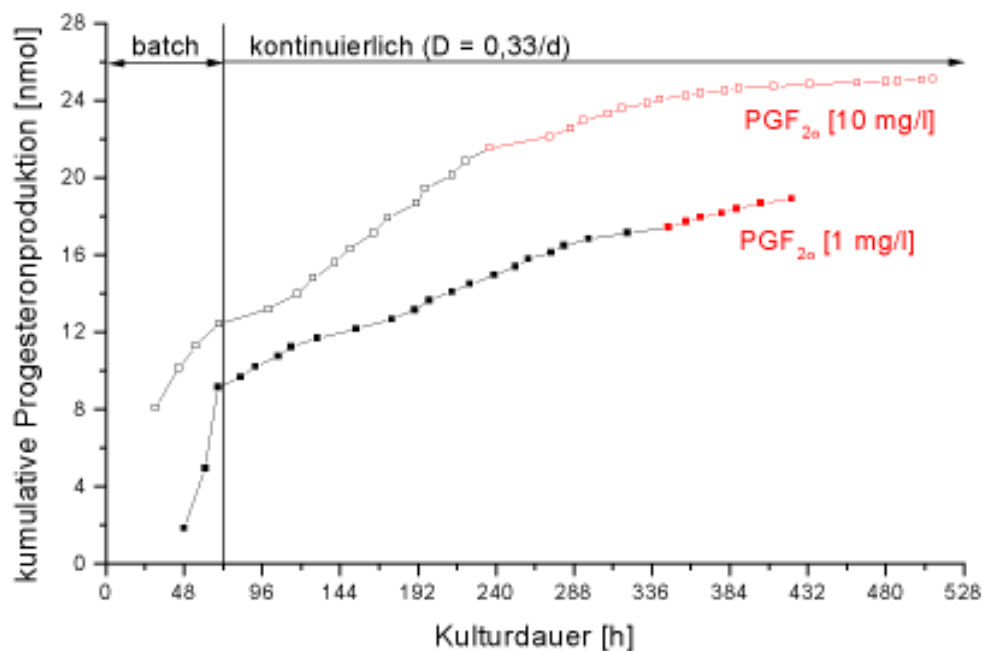


Abb. 3.42: Kumulative Progesteronproduktionen der Reaktorläufe WS-3 und WS-4 unter Einfluß der unterschiedlichen Konzentrationen an $\text{PGF}_{2\alpha}$ zum Ende der Kultur
Die Kulturintervalle unter Einfluß des Prostaglandins sind jeweils Rot dargestellt.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Langzeitkultur primärer Lutealzellen aus dem Gelbkörper des Rindes etabliert und die Lutealfunktion in klassischer Flaschenkultur als auch in einem dafür entwickelten kontinuierlichen Bioreaktor untersucht. Die Lutealzellen wurden aus Corpora lutea von Schlachtrindern präpariert, unter verschiedenen Kulturbedingungen über mehrere Monate kultiviert und auf ihre Fähigkeit zur Produktion des Steroidhormons Progesteron in vitro untersucht.

4.1 Endokrinologie der Fortpflanzung des Rindes

Die Fortpflanzung des Rindes wird vom Hypothalamus-Hypophysen-Komplex als übergeordnetem endokrinen Drüsensystem reguliert. Die endokrine Aktivität der Hypophyse wird über den Hypothalamus durch Ausschüttung von Gonadotropin-Releasing-Hormonen (Gn-RH) gesteuert. Die Hypophyse sezerniert unter dem Einfluß der Releasing-Hormone FSH-RH und LH-RH das follikelstimulierende Hormon (FSH) bzw. das luteinisierende Hormon (LH). Diese beiden Hormone induzieren die Follikelreifung und die Ovulation im Ovar. Das aus dem ovulierten Follikel entstehende Corpus luteum ist ein temporär endokrin aktives Organ. Das Corpus luteum periodicum des Rindes sezerniert für 18 Tage Progesteron. Die Zielorgane des Progesterons sind der Hypothalamus, die Hypophyse, der Uterus und das Ovar selbst. Progesteron verhindert eine weitere unmittelbare Ovulation durch direkte Hemmung der Reifung tertiärer Follikel im Ovar sowie durch negative Rückkopplung auf die Gn-RH-Ausschüttung des Hypothalamus und das Ausbleiben der FSH-Freisetzung aus der Hypophyse. Es induziert eine Gn-RH unabhängige Sekretion von LH aus der Hypophyse, entsprechend einer positiven Rückkopplung, die ihrerseits die Gelbkörperentwicklung fördert (Abb. 4.1).

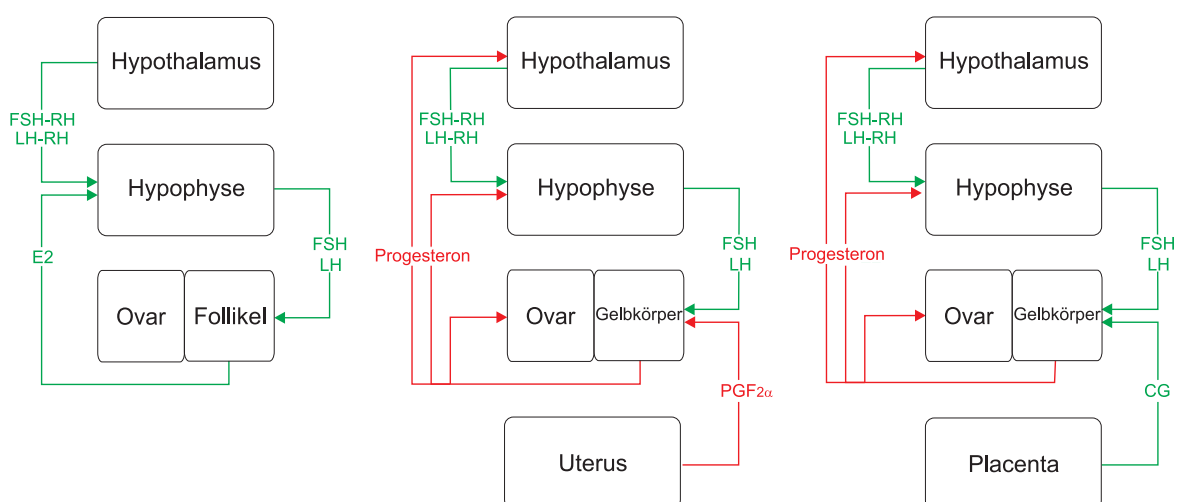


Abb. 4.1: Regelungsweise und Wirkung der weiblichen Geschlechtshormone (vereinfacht)

Grün: Stimulation; Rot: Hemmung

links: Regulation in der Follikelphase

mitte: Regulation in der Gelbkörperphase

rechts: Regulation bei Schwangerschaft

Progesteron bewirkt außerdem eine Zunahme der Zellproliferation und die Sekretion von Utermilch im Endometrium und bereitet die Einnistung und die histiotrophe Versorgung der befruchteten Eizelle vor. Findet allerdings bei Ausbleiben der Befruchtung keine Einnistung der Eizelle im Endometrium statt, so erfolgt die Regression des Gelbkörpers (Luteolyse) aufgrund der Ausschüttung von Prostaglandin $E_{2\alpha}$ durch das Endometrium. Der Abfall der Progesteronkonzentration nach Luteolyse bewirkt die Aufhebung der Follikelreifungshemmung im Ovar und den Wegfall der Blockade hypophysärer FSH-Ausschüttung. Die nun erfolgende Reifung eines weiteren Graafschen Follikels wirkt ihrerseits über die Bildung von Estradiol 2 (E_2) auf die Hypophyse in positiver Rückkopplung. Diese schüttet schließlich das LH aus, dessen nadelförmiger Anstieg im Blut den ovulatorischen Reiz für den Graafschen Follikel darstellt (Abb. 4.2).

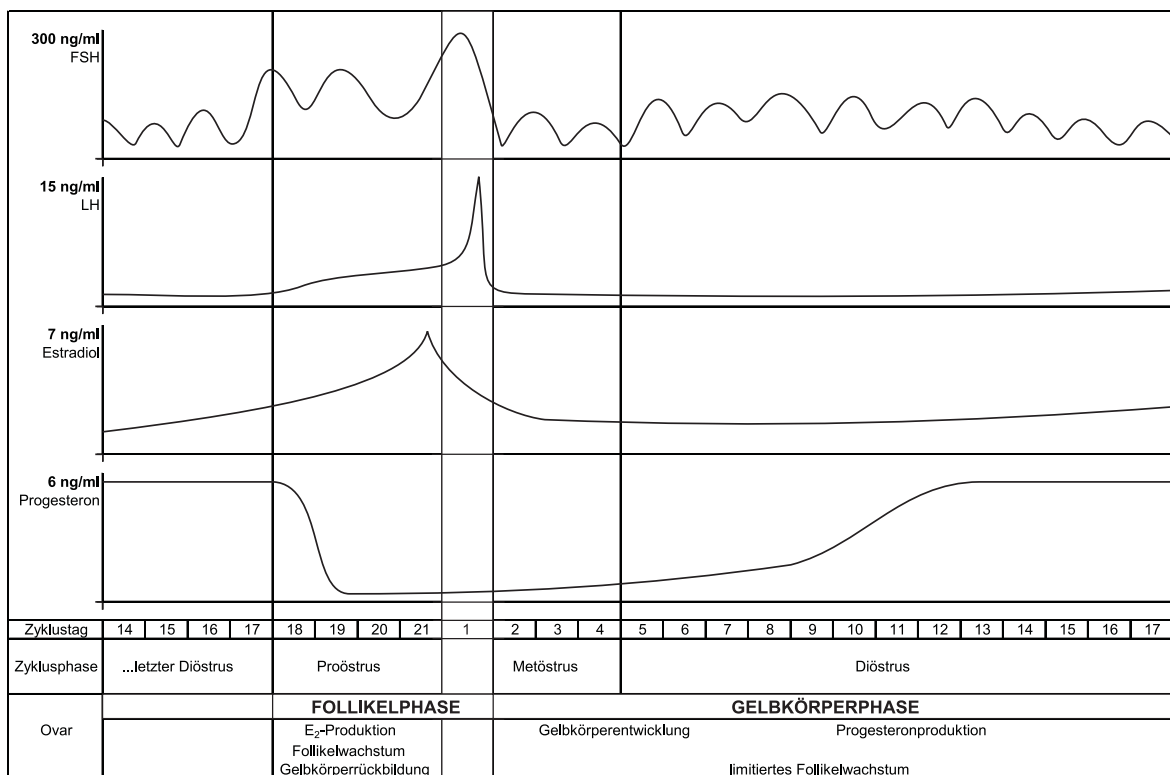


Abb. 4.2: Verlauf der Plasmakonzentrationen von FSH, LH und Progesteron über den Zyklusphasen

Im Falle einer erfolgreichen Einnistung der befruchteten Eizelle im Uterus bleibt die Luteolyse aus und die Progesteronproduktion des Gelbkörpers (Corpus luteum graviditatis) bleibt bis weit in die 280 Tage andauernde Gravidität erhalten. Dies wird durch Choriongonadotropin (CG) gewährleistet, das vom etablierten Trophoblasten im Uterus produziert wird und analog zu LH an den gleichen Rezeptor der Lutealzellen bindet. Choriongonadotropin ist ein Proteohormon, das mit dem luteinisierenden Hormon viele Homologien aufweist (LUSTBADER ET AL., 1995; LAPHORN ET AL., 1994).

Humanes Choriongonadotropin (hCG) wird in der veterinärmedizinischen Klinik zur Sterilitätsbehandlung bei Rindern eingesetzt und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für eine basale Stimulation der bovinen Lutealzellen in Primärkultur verwendet.

Der hohe Progesteronspiegel im Blut verhindert bei Gravidität eine erneute Ovulation. Erst zum Ende der Trächtigkeit kommt es beim Rind zu einer Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induzierten Regression des Gelbkörpers durch das Endometrium, welches auch die Progesteronproduktion bis zur Geburt übernimmt. Das Corpus luteum bestimmt also mit seiner endokrinen Sekretion die Zyklusdauer, gewährleistet die Reifung und Ovulation eines einzigen Graafschen Follikels und verhindert bei Schwangerschaft eine weitere Ovulation. Der luteale Regelkreis stellt eine biologische Uhr dar, der die Frequenz aufeinander folgender Ovulationen bestimmt.

Der Zyklus des Rindes dauert 21 Tage. Er wird traditionell in vier verschiedene Zyklusphasen unterteilt. Der Östrus ist durch die Ovulation gekennzeichnet, die beim Rind nach einem Tag abgeschlossen ist. Es schließt sich der Metöstrus mit einer Dauer von 3 Tagen als Übergangsphase zum Diöstrus an. Der 13 - tägige Diöstrus mit massiver Gelbkörper-Hypertrophie mündet schließlich in den 4 Tage dauernden Proöstrus, der durch die Regression

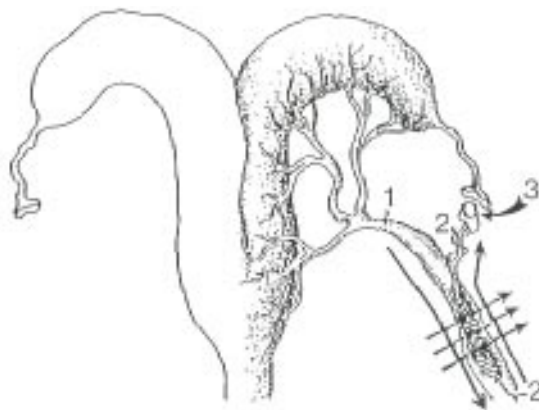


Abb. 4.3: Übertritt von $PGF_{2\alpha}$ aus den Uterusvenen (1) in die Arteria ovarica (2) über ein Gegenstromsystem. Direkte Versorgung des Ovar (3)
(aus RÜSSE UND SINOWATZ, 1991)

des Gelbkörpers und die Reifung eines neuen Graafschen Follikels gekennzeichnet ist. In der Mitte des Diöstrus (9. - 11. Tag) steigt die Progesteronkonzentration im Blut langsam auf ein Plateau von 6 mg/l Plasma an und fällt im Proöstrus innerhalb eines Tages (19. Tag) auf einen basalen Wert von < 0,5 mg/l Plasma ab (Abb. 4.2).

Der hohe Progesteronspiegel führt zu einer vom Hypothalamus unabhängigen LH-Ausschüttung, die in positiver Rückkopplung wiederum das Lutealwachstum stimuliert. Bei ausbleibender Gravidität allerdings produziert das Endometrium des Rindes am 17. und 18. Tag $PGF_{2\alpha}$, das vermutlich unmittelbar über ein Gegenstromsystem der Uterusvenen und der Arteria ovarica in den Gelbkörper gelangt (RÜSSE UND SINOWATZ, 1991) und dessen Atresie veranlaßt (Abb. 4.3).

4.2 Bildung und Wachstum des Corpus luteum

Unmittelbar nach der Ovulation differenzieren sich die Zellen der Theca interna des Graafschen Follikels in kleine Lutealzellen (SLC) sowie Fibroblasten und die des Stratum granulosum in große Lutealzellen (LLC) um (ALILA AND HANSEL, 1984). Die epitheloiden Theca interna-Zellen sind in der Follikelreifungsphase für die Östrogenproduktion verantwortlich; das Granulosagewebe bildet den Liquor follicularis (Abb. 4.4). In der auf elf Tage begrenzten Phase mit sehr hohem Zellteilungswachstum bildet sich aus der Hohlkugelgestalt des präovulatorischen Follikels ein massives parenchymatisches Lutealgewebe mit starker Vaskularisierung und einer bindegewebigen Kapsel (FIELDS AND FIELDS, 1996).

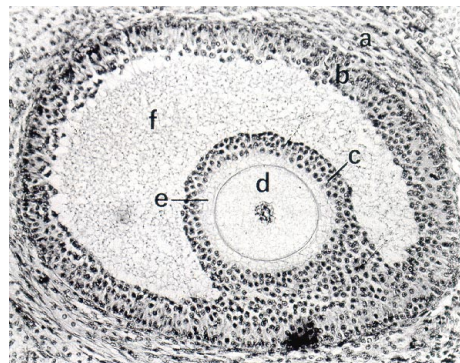


Abb. 4.4: Präovulatorischer Follikel. (a)Theca externa, (b) Theca interna, (c) Zona granulosa, (d) Eizelle, (e) Zona radiata, (f) Liquor follicularis (aus SMOLLICH UND MICHEL, 1992)

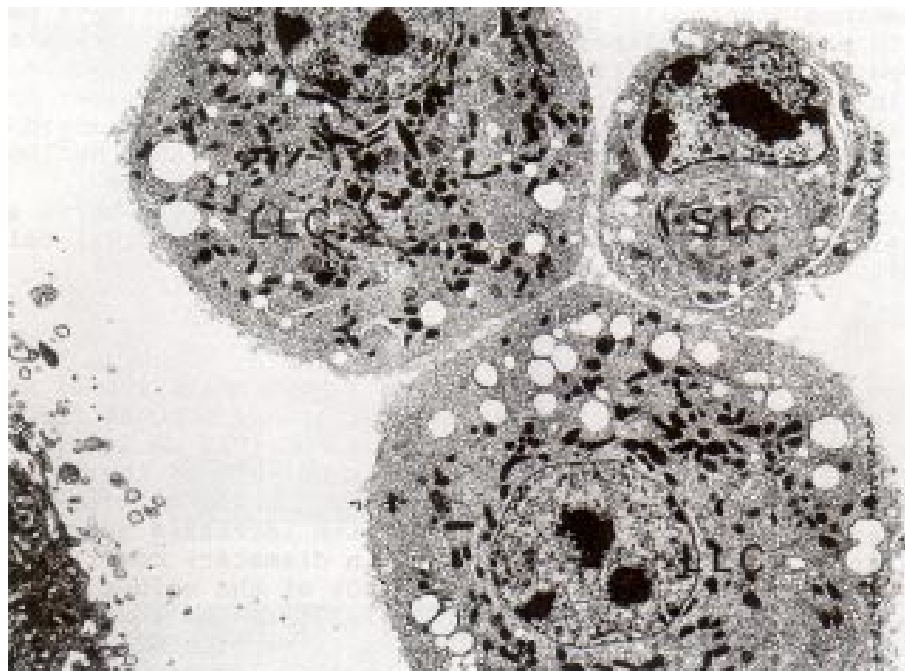


Abb. 4.5: Bovine Lutealzellen nach Collagenase-Verdau
Es lassen sich große Lutealzellen (LLC) und kleine Lutealzellen unterscheiden (SLC). Neben der Größe haben sie auch eine andere Zellkerngestalt. Große Lutealzellen zeigen einen kugeligen, kleine Lutealzellen einen halbkugelförmigen Zellkern. Die hellen Vesikeln enthalten Lipide (TEM-Aufnahme, aus FIELDS AND FIELDS, 1996).

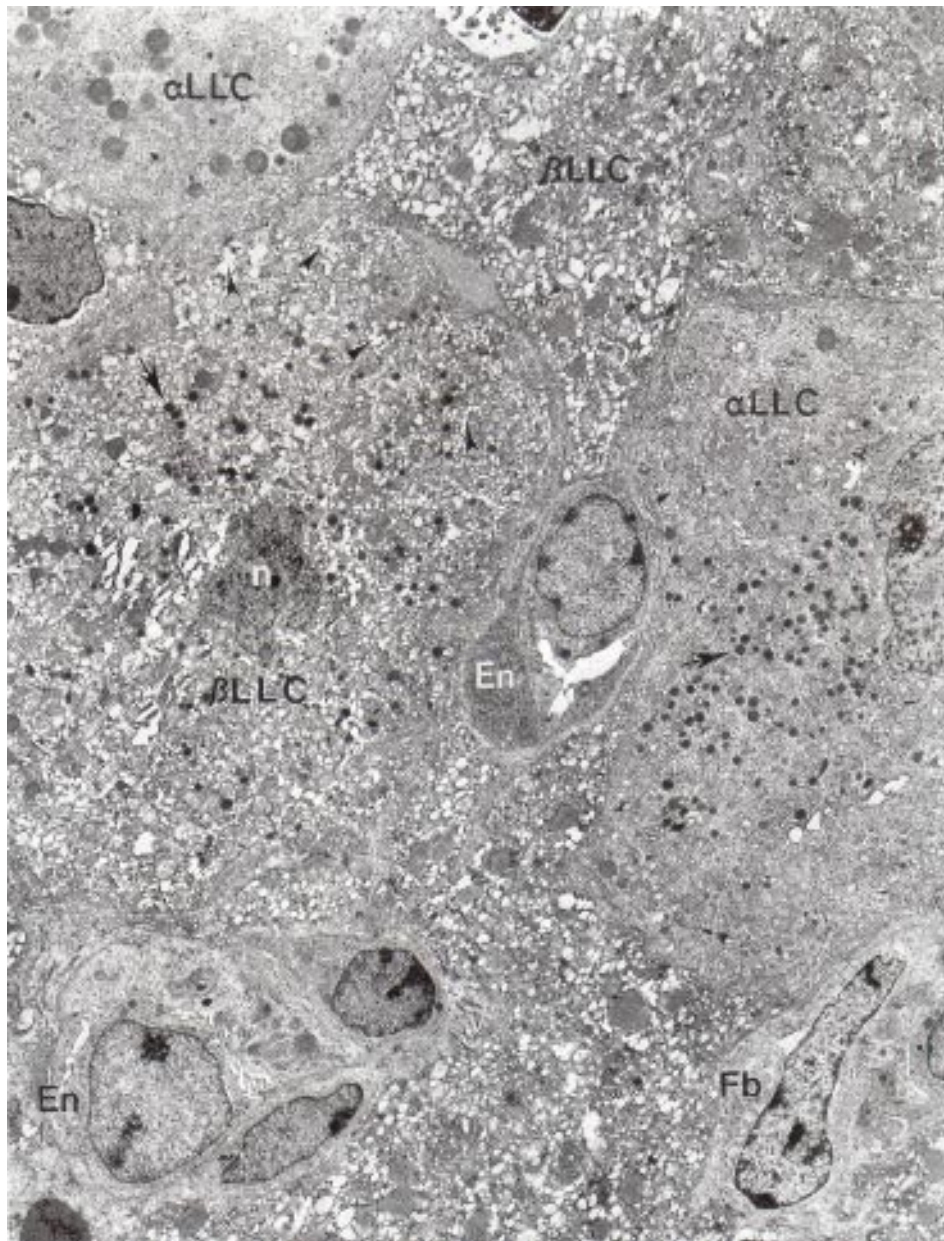


Abb. 4.6: Histologischer Schnitt durch einen sieben Tage alten Gelbkörper mit verschiedenen großen Lutealzellen (α -LLC, β -LLC), Endothelzellen (En) und Fibroblasten (Fb)

Man kann Zellkerne (n), Teile des endoplasmatischen Retikulums (Pfeilspitzen) sowie eine Vielzahl von sekretorischen Vesikeln erkennen (Pfeile), die aufgrund der Fixierung dunkel erscheinen (TEM-Aufnahme, Vergr. 5000-fach; aus FIELDS AND FIELDS, 1996).

Die Zellmasse kann sich in der kurzen Phase des Wachstums von 30 - 50 mg des reifen Follikels (ohne Liquor follicularis) bis zu 5 g des Gelbkörpers im Blütestadium (14. - 16. Tag des Zyklus) verhundertfachen (FIELDS AND FIELDS, 1996). Die Lutealzellen bilden 70 % der Zellmasse des Gelbkörpers mit 30 % Anteil an der Gesamtzellzahl. Den größten Anteil an der Zellzahl des Gelbkörpers nehmen Endothelzellen (EC) ein.

Sie wandern zusammen mit Makrophagen aus dem ovarialen Kapillarbett in das proliferierende Lutealgewebe ein (O'SHEA ET AL., 1990, 1989). Die LLC zeigen eine LH-unabhängige, basale Progesteronproduktionsrate (MILVAE, 1991). Die SLC sind durch LH in ihrer Produktionsrate stimulierbar (HANSEL AND DOWD, 1986). Darüber hinaus unterscheiden sie sich in ihrer zellulären Ultrastruktur (Abb. 4.5). Eine weitere Unterteilung der LLC und SLC in α und β Subtypen ist möglich (FIELDS AND FIELDS, 1996, FIELDS ET AL., 1991).

Die Regression des Gelbkörpers nach $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Induktion erfolgt durch Phagozytose apoptotischer Lutealzellen über Makrophagen und sukzessive Substitution durch Fibroblasten. Erst weit im nächsten Zyklus wird der bindegewebige Anteil des atretischen Gelbkörpers absorbiert und bleibt als sichtbare Narbe im Ovarialgewebe erhalten.

4.3 Die Präparation von Lutealzellen aus dem Corpus luteum

Für die Isolation der Lutealzellen aus dem Gelbkörper wurde ein Verfahren etabliert, welches sich an die Präparation von Follikel- und Lutealzellen der Ratte (MAGOFFIN AND ERICKSON, 1988; MCNAMARA ET. AL., 1980) anlehnt und einzelne methodische Aspekte der Isolation von Ratten-Hepatocyten (DOYLE ET. AL., 1995; KOEBE ET. AL., 1994) aufgreift.

Das Lutealgewebe ähnelt in mikroanatomischer Sicht dem der Leber. Bei beiden handelt es sich um parenchymatöse Gewebe mit starker Vaskularisierung und bindegewebiger Kapselung. Eine Dauerperfusion des Gelbkörpers ähnlich der Leber (KOEBE ET. AL., 1994) ist allerdings aufgrund der schlechten Zugänglichkeit der Arteria ovarica, bedingt durch die Organentnahme am Schlachthof, nicht möglich. Die Infusion der Wasch- und Enzymlösungen über Gefäße, die an der bindegewebigen Oberfläche des Gelbkörpers liegen, war allerdings ausreichend. Die anschließende mechanische Dissoziation gewährleistete eine Primärsuspension an Zellen, die keine größeren Gewebeanteile enthielt. Nach Abtrennung von Erythrozyten und Zelldetritus wurde die Suspension in Kultur genommen. Für die Fragestellung der Arbeit war es nicht nötig eine Reinkultur der Lutealzellen anzufertigen. Die somit nicht auszuschließende Cokultur mit Fibroblasten sowie Endothelzellen stellte keine Probleme hinsichtlich des Wachstums der Lutealzellen und ihrer Progesteronproduktion dar. Eventuell ist sie sogar als förderlich einzustufen, solange kein Überwachsen mit Fibroblasten zu beobachten ist. Fibroblasten und Endothelzellen sezernieren Wachstumsfaktoren und Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Collagene, Fibronectin und Laminin. Dadurch entsteht in Cokultur ein Mikromilieu, welches den natürlichen Bedingungen im Gewebeverband besser entspricht als die einfache Beschichtung der Kulturflächen mit regeneriertem Collagen. Die lokale Anhäufung von stimulierenden Faktoren kann darüber hinaus den Differenzierungsgrad lutealer Primärzellen stabilisieren (FURMAN ET AL., 1986) und ihre Sensitivität gegenüber luteotropen Effektoren erhöhen (SPICER AND STEWART, 1996; ZACHOW AND TERRANOVA, 1994). Der Erfolg der Inkulturnahme ließ sich bereits nach zwei Tagen mikroskopisch durch Kontrolle der Anheftung und Ausspreitung der Zellen beobachten und nach Vorkultur für 3 bis 7 Tage konnten die Kulturexperimente begonnen werden.

4.4 Primärkultur der Lutealzellen

Die Lutealzellen eignen sich sehr gut zur Untersuchung endokriner Organfunktionen in vitro. Trotz ihres hohen Differenzierungsgrades ist es möglich, die Zellen über mehrere Monate in Kultur zu halten und ihre Fähigkeit zur Progesteronproduktion zu untersuchen. Sie zeigen gutes Teilungswachstum und lassen sich auch nach langer Kultur über mehrere Wochen durch Zugabe von endokrinen Regulatoren im Produktionsverhalten steuern. Die hohen Produktionsraten und die Stimulierbarkeit zeigen, daß die Zellen ihren hohen Differenzierungsgrad in Kultur aufrechterhalten.

Im Gegensatz zur Organkultur, bei der die Gewebestruktur erhalten bleibt und die Zellen in ihrer gewachsenen, extrazellulären Matrix verbleiben, werden für Primärkulturen die Zellen aus ihrem Gewebeverband herausgelöst. Diese Desintegration hat gravierende Folgen für die Organisation des Zytoskeletts und spezifische zelluläre Funktionen.

Die Kultur differenzierter Primärzellen stellt somit erhöhte Anforderungen an die Kulturbedingungen und an die verwendeten Kulturmedien, wenn der Differenzierungsgrad der Zellen erhalten bleiben soll. Gegenüber etablierten Linien embryonaler oder transformierter Zellen zeigen Primärzellen in Kultur deutlich geringere und inhomogene Zellteilungsraten, beschleunigte Alterungsprozesse (FRESHNEY 1990) und nach Erreichen der Konfluenz eine Arretierung in der G1-Phase des Zellzykluses (ALBERTS ET AL., 1990).

4.4.1 Verwendete Kulturmedien und fetales Kälberserum als Mediumzusatz

Die kommerziell angebotenen Medien für die Säugerzellkultur unterscheiden sich im wesentlichen in der Wahl des Puffersystems, der Vitaminausstattung, dem Gehalt an Spurenelementen sowie den Kohlehydraten und Aminosäuren, die zur Energiebereitstellung verstoffwechselt werden können.

Für die Kultur der Lutealzellen wurden definierte Minimalmedien verwendet. Die Primärkultur wurde zunächst mit dem Minimalmedium nach der Rezeptur von Eagle (MEM-E, Rezeptur siehe Anhang 2) etabliert, welches sich in unserer Arbeitsgruppe zur Kultur von embryonalen murinen Fibroblasten bewährt hatte (KEINER, 1991), und in einem zweiten Schritt durch Verwendung eines Minimalmediums mit Modifikation nach Dulbecco (D-MEM, Rezeptur siehe Anhang 2) optimiert. Beide Medien wurden bereits in den sechziger Jahren entwickelt, etabliert (MEM-E: EAGLE, 1955; D-MEM: MORTON, 1970; DULBECCO AND FREEMAN, 1959) und sind seit dieser Zeit in unveränderter Rezeptur die Standardmedien in der Zellkultur. Sie werden zur Kultur transformierter Zellen und etablierter Zelllinien eingesetzt und sind auf hohe Proliferationsraten sowie hohe Zelldichten optimiert. Durch Zusatz entsprechender Supplemente wird den besonderen Erfordernissen der jeweils kultivierten Zellen Rechnung getragen.

Die überwiegende Zahl animaler Gewebszellen nutzt Glucose als primäre Energiequelle (KREBS, 1972). In Kultur zeigen verschiedene transformierte Zellen und Primärzellen allerdings Präferenzen für andere, alternativ angebotene Kohlehydrate und Aminosäuren. Embryonale Amphibienzellen decken ihren Energiebedarf über die Verstoffwechselung von Pyruvat und Aminosäuren (DWORKIN AND DWORKIN-RASTL, 1991). Verschiedene Tumorzellen in vivo und in Kultur verstoffwechseln Pyruvat, Malat (EIGENBRODT ET AL., 1994) sowie Glutamin und Glutamat (REITZER ET AL., 1979). Sie zeigen eine substratabhängige Verschiebung vom Glycolyse-Stoffwechsel z.B. zu verstärkter Glutaminolyse durch Veränderung des Expressionsmusters der beteiligten Enzyme und Aktivierung entsprechender membranständiger Shuttle-Systeme (MAZUREK ET AL., 1997, 1996). Epithelzellen des Huhns benötigen Glucose und Glutamin in äquimolarem Verhältnis für optimales Wachstum in Kultur (BARBEHENN ET AL., 1984). Hepatocyten schließlich können sogar in Glucose-freiem Medium kultiviert werden. Sie decken ihren Bedarf an Glucose über die Gluconeogenese (BERTOLOTTI, 1977).

Für die Primärkultur der bovinen Lutealzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluß des Zusatzes von Pyruvat (0,48 mM) und der Wechsel von einem minimalen Medium (MEM-E, 292 mg/l Glutamin) auf ein anderes mit doppeltem Glutamingehalt (D-MEM, 584 mg/l Glutamin) untersucht. Die Pyruvatsupplementierung erbringt eine deutliche Steigerung der Progesteronproduktion. Der Mediumwechsel zeigt ebenfalls eine deutliche Verbesserung der Produktionsleistungen sowie ein besseres Anwachsen der Zellen nach der Gewebepreparation. Neben dem Glutamingehalt unterscheidet sich das D-MEM im wesentlichen durch die erhöhte Carbonat-Pufferung, den Zusatz von Eisennitrat sowie veränderte Gehalte an Aminosäuren und Vitaminen (FRESHNEY 1990).

Die Verwendung von Glutamin und Glutamat als Medienzusatz erfordert je nach Kultivierungsbedingungen eine Erniedrigung des pH-Wertes im Kulturvolumen. Durch zelluläre Glutaminolyse, extrazellulären Umsatz durch sezernierte Glutaminasen sowie durch spontane Autolyse des Glutamins können beträchtliche Mengen an Ammonium entstehen (LINDL UND BAUER, 1987). Das Ammonium steht mit dem cytotoxischen Ammoniak in einem pH-abhängigen Gleichgewicht. Durch Senken des pH-Wertes von dem in der Zellkultur üblichen Wert von 7,3 auf 7,2 oder 7,1 kann dieses Gleichgewicht zugunsten des Ammoniaks verschoben werden. Über den Ammoniumgehalt können darüber hinaus die Glycosylierungsmuster der in Zellkultur exprimierten Proteine günstig beeinflusst werden (GAWLITZEK ET AL., 1999, 1998, 1995; RYLL AND WAGNER, 1991).

Neben der Supplementierung des Mediums mit Kohlehydraten, Aminosäuren und Vitaminen hat der Zusatz von Seren und fetalen Seren entscheidenden Einfluß auf das Wachstums- und Produktionsverhalten der Zellen. So ist fetales Kälberserum (FKS) in den meisten Fällen für eine dauerhafte Proliferation der Zellen notwendig; die Dosierung sollte aber so gering wie möglich gehalten werden. Fetales Kälberserum ist ein komplexes Gemisch aus Transportproteinen (Albumin, Transferrin), Hormonen (Insulin, Hydrocortison) und Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, IGF) sowie Vitaminen und Spurenelementen (MCLEAN, 1986;

HOLLENBERG AND CUATRECASAS, 1973). Es ist in seiner Zusammensetzung inhomogen (BARNES AND SATO, 1980) und viele der zellbiologischen Wirkungen der zum Teil noch unbekannten Komponenten auf die Kultur sind ungeklärt. Die enthaltenen Wachstumsfaktoren und Hormone haben überwiegend mitogene Wirkung und fördern die Adhäsion der Zellen. Eine Reihe von Zelllinien zeigen bereits unter Einfluß von 10 % (v/v) FKS deutliche Dedifferenzierungserscheinungen. So führt bei Primärzellen die Zugabe von FKS in vielen Fällen zu einer Verringerung spezifischer Leistungen des Sekundärstoffwechsels, zum Verlust zellspezifischer Oberflächenmarker und von Elementen des Cytoskeletts. Transformierte Zellen mit hohen Proteinexpressionsraten sezernieren in serumhaltiger Kultur weniger Proteine und diese mit verändertem Glycosylierungsmuster. Hybridomazellen zeigen in serumhaltiger Kultur geringere Produktionsraten von Antikörpern niedriger Affinität.

ORLY ET AL. (1982) empfehlen für die Untersuchung der Regulation ovarialer Steroidgenese in Lutealzellkultur ein serumfreies Medium mit definierten Zusätzen wie Insulin, Transferrin, Hydrocortison und Fibronectin (4F-Medium). Die Substitution erfordert allerdings aufwendige und kostspielige Kulturexperimente, in denen die Kombination und die Konzentrationen der einzelnen essentiellen Supplemente ermittelt werden müssen. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragestellungen war der mögliche Einfluß von Hormonen und Wachstumsfaktoren des verwendeten FKS als basale Stimulatoren von untergeordneter Bedeutung. So wurde für die Kultur der Lutealzellen ein minimaler FKS-Zusatz von 5 % (v/v) aus einer einzigen Lieferungsscharge gewählt.

4.4.2 Charakterisierung der Lutealzellen

Die Zellen konnten nach einer Kultur von 7 Tagen mittels verschiedener cytochemischer Verfahren als Lutealzellen identifiziert werden.

Nach Sudan-III-Färbung erschienen die lipidhaltigen Vesikeln durch Einlagerung der verschiedenen Farbstoffkomponenten in rötlichen und rotbraunen Farbtönen. Die Steroidbildung konnte über den enzym-cytochemischen Nachweis der Aktivität eines Schlüsselenzyms der Steroidgenese in den Lutealzellen gezeigt werden.

Der enzymatische Schritt der Oxidation von Δ^5 -Pregnenolon über eine spezifische $\Delta^5\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (vgl. Abschnitt 4.4.4) erfordert die Anwesenheit eines Cosubstrates, welches bei der Reaktion als Protonenakzeptor auftritt und selbst reduziert wird. Wird das chromogene Cosubstrat Nitrotetrazolium-Blau (NBT) verwendet, so kann als spezifischer Nachweis der Umsatz aus der Bildung eines amorphen Formazan-Niederschlags der Progesteronsynthese nachgewiesen werden. In Lutealzellen mit hoher Progesteronproduktion ist die $\Delta^5\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase das Enzym mit der höchsten Aktivität des Sekundärstoffwechsels. Bei Einsatz von Substraten im Überschuß fallen die enzymatischen Aktivitäten anderer zellulärer Dehydrogenasen nicht ins Gewicht und zeigen bei den gegebenen Inkubationszeiten keinen sichtbaren Formazan-Umsatz (GREGORASZCZUK AND

WOJTUSIAK, 1982; FISCHER AND KHAN, 1972). Dies konnte hier durch Verwendung von Fibroblasten in einem Kontrollexperiment bestätigt werden.

Durch die Etablierung eines spezifischen cytologischen Fluoreszenznachweises der Ligand-Rezeptorbindung des für Ovarial- und Lutealzellen charakteristischen LH-Rezeptors konnte schließlich die Identität der Lutealzellen in Kultur bestätigt werden. Darüber hinaus belegt das Vorhandensein der Rezeptoren einen hohen Grad an Differenzierung der Lutealzellen auch nach längerer Kulturdauer.

Die Dichtegradientenzentrifugation eignet sich neben der Möglichkeit der präparativen Aufreinigung von Zellen auch zu ihrer weiteren Charakterisierung als luteale Zellen. Der Vergleich der Sedimentation läßt, bei gleichen Protokollen, auf die Identität der Zellfraktion rückschließen. Es erwies sich als ausreichend, die Zentrifugation einer fluoreszenzmarkierten Suspension von Lutealzellen aus einer etablierten Kultur vorzunehmen und das sich ergebende Bandenmuster mit nachfolgenden Präparationen zu vergleichen, bei denen auf eine Fluoreszenzmarkierung verzichtet wurde. So konnte jeweils die Lutealzellbande über die fluoreszierende Bande der Referenz-Zentrifugation identifiziert werden. Für die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung der Lutealzellen mußten die Zellen für 7 Tage hCG-frei kultiviert werden. Dies gewährleistete die ausreichende Zahl ligandenfreier LH-Rezeptoren zur Bindung des FITC-markierten hCG. Das Absinken der Hormonkonzentration führt darüber hinaus durch verstärkte Expression der Rezeptoren und Exposition auf der Zelloberfläche zu einer Erhöhung der Hormonsensitivität. Eine Fluoreszenzmarkierung frisch präparierter Zellsuspension konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Entweder werden die LH-Rezeptoren durch den enzymatischen Verdau geschädigt oder sie sind in überwiegender Zahl so mit LH besetzt, daß das zwar im Überschuß zugesetzte FITC-hCG nicht in ausreichendem Maße binden kann.

4.4.3 Eigenschaften der Lutealzellen in klassischer batch-Kultur

In Kultur wachsen die Lutealzellen innerhalb von vier Tagen zu einem konfluenten Monolayer aus und erreichen nach insgesamt sechs Tagen Kulturdauer das Stadium eines überkonfluenten Monolayers. In diesem stabilen Wachstumszustand zeigen die Zellen gegenseitige Überlappung ihrer cytoplasmatischen Fortsätze und sind nicht mehr vollständig auf der Kulturfläche angeheftet. Die Kinetik des Wachstums der Lutealzellen ist für Säugerzellen in Primärkultur typisch. Im Gegensatz zu transformierten Zellen zeigen sie im allgemeinen geringere Teilungsraten (FRESHNEY 1990) und damit längere Verdopplungszeiten. Mit einer Verzögerung (Lag-Phase) nach Ausplattieren auf die neue Kulturfläche von etwa 24 h gelangen die Zellen für 2 bis 2,5 Tage in eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase). Dann wird die Limitierung der Kulturfläche bemerkbar und die einsetzende Kontaktinhibition der Zellen bei Erreichen der Konfluenz leitet über in eine stabile Phase (Stat-Phase) ohne nennenswerte Zellteilungen. Das hier beobachtete überkonfluente Wachstum der Zellen ist allerdings für differenzierte Zellen ungewöhnlich. Die ermittelten Verdopplungszeiten der

Lutealzellen mit 30 h sind im Vergleich zu anderen Primärzellen aber auch mit den verschiedenen etablierten, transformierten Zellen als relativ kurz einzustufen (DSMZ, 1998; BUTLER, 1991). Die Zellen wachsen im Gelbkörper in vivo in kurzer Zeit aus den Resten des ovulierten Follikels zu einem massiven parenchymatösen Gewebe heran. Im histologischen Schnitt zeigt sich im Vergleich zu epithelialen Geweben eine geringe mikroanatomische Strukturierung und Differenzierung.

4.4.4 Stimulation und Inhibition der Lutealzellkultur

Die Lutealfunktion unterliegt endokriner und parakriner Kontrolle. Ihre Regulation verläuft bei den verschiedenen Säugetierarten zum Teil nach sehr unterschiedlichen Mechanismen. Die Einflüsse der verschiedenen Regulationsfaktoren sind somit auch bei der Kultur von Primärzellen zu beachten.

Das Corpus luteum des Rindes unterliegt einer Stimulation durch LH und CG (DHARMARAJAN ET AL., 1994). Die Progression des Gelbkörpers und damit auch die Synthese an Progesteron wird durch FSH induziert schließlich durch LH sowie CG auf hohem Niveau aufrechterhalten. Eine stimulierende Wirkung zeigt auch das humane Choriongonadotropin (hCG) (DAVIS ET AL., 1996). Der Einfluß von Prolactin ist dagegen gering (HOFFMANN ET AL., 1974). In Kultur ist die Stimulation ebenso zu beobachten. Luteale Zellen zeigen in Kultur nach Zugabe von LH und hCG eine Zunahme der Proliferation, der Zelldifferenzierung und der Progesteronproduktion (O'SHAUGHNESSY AND WALTHES, 1985).

Die Abnahme der Progesteronproduktion und die Regression des Gelbkörpers wird beim Rind über $\text{PGF}_{2\alpha}$ induziert (DAVIS ET AL., 1996; RUEDA ET AL., 1995; ZHENG ET AL., 1994; JUENGEL ET AL., 1993). Prolactin hat auf die Luteolyse beim Rind keinen Einfluß (KANUKA ET AL., 1997). In Langzeitexperimenten in Multiwell-Kultur konnte der luteolytische Effekt von Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ untersucht werden.

In der Langzeitkultur LZT-2 wurde zum Ende der Kultur in zwei der vier parallelen Ansätze das Prostaglandin in einer Endkonzentration von 1 mg/l zugesetzt. Bei dieser Konzentration zeigte sich kein Rückgang der Progesteronproduktion. Im Langzeitexperiment LZT-3 wurden ebenfalls zum Ende der Kultur die Lutealzellen jedoch dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der erhöhten Konzentration von 10 mg/l ausgesetzt. Hier zeigte sich innerhalb eines Probenintervalls das vollständige und sofortige Sistieren der Progesteronproduktion bis an die Nachweisgrenze des verwendeten RIA. Der exponentielle Abfall der vorhandenen Konzentration an Progesteron unmittelbar nach Zugabe des luteolytischen Faktors entspricht dem Ausschwemmen gemäß der vorgegebenen Verdünnungsrate. Die Progesteronproduktion ist vollständig unterbunden und die Elimination aus dem Bioreaktor erfolgt in Analogie zu dem physiologischen Phänomen der renalen Clearance.

Die biologische Wirksamkeit des luteolytischen $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Lutealzellen in Primärkultur liegt also zwischen 1 und 10 mg/l. Die Untersuchung des Einflusses des Prostaglandins auf die Lutealfunktion ist somit experimentell und quantitativ möglich und kann zur Abschätzung des Differenzierungsgrades der Lutealzellen verwendet werden.

Die zueinander homologen Proteohormone LH und CG binden an den membranständigen LH-Rezeptor der Lutealzellen. Es werden intrazellulär verschiedene Signalketten aktiviert, die den zytoplasmatischen Transport des Cholesterins und die Expression der benötigten Enzyme regulieren (DAVIS ET AL., 1986). Freies Lipoprotein im Serum mit gebundenem Cholesterin kann die Progesteronsyntheserate modulieren.

4.4.5 Progesteronproduktion der Lutealzellkultur

Zur Biosynthese des Progesterons verwenden Lutealzellen das Cholesterin als Vorstufe. Ein Teil des Cholesterinbedarfs wird über rezeptorvermittelte Endocytose von Lipoproteiden aus dem Serumpool gedeckt (CARROLL ET AL., 1991). Außerdem kann Cholesterin von den Lutealzellen aus aktivierter Essigsäure über Isoprenoid-Formierung (VOET UND VOET, 1992) neusynthetisiert werden (HINSHELWOOD ET AL., 1993). Über das sogenannte Cholesterin-Seitenketten-spaltende Enzym (CSSE) wird Pregnenolon gebildet, das in zwei Schritten zu Progesteron umgesetzt wird. Zunächst wird über das Enzym $\Delta^5\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase die Hydroxylgruppe des Pregnenolons an Position 3 durch Oxidation in eine Carbonylgruppe überführt und anschließend durch das Enzym $\Delta^{4,5}$ Isomerase die Doppelbindung von Position 5 nach 4 umgelagert (Abb. 4.7).

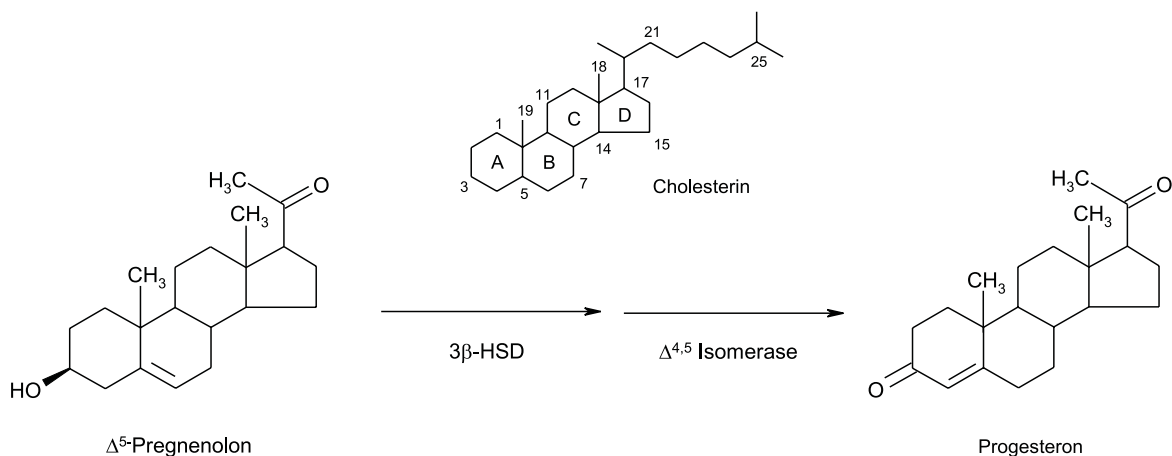


Abb. 4.7: Synthese des Progesterons aus Pregnenolon in zwei Schritten:
Oxidation am C3 durch die Δ^5 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) und anschließende Umlagerung der Doppelbindung von C5 nach C4 durch die $\Delta^{4,5}$ Isomerase.

Lutealzellen können große Mengen an Cholesterin und Steroidzwischenstufen in Vesikeln speichern. Progesteron wird allerdings bedarfsgerecht produziert und nicht vesikulär bevorratet. Durch Lyse oder Apoptose der Zellen kommt es nicht zu einer erhöhten Freisetzung von Progesteron durch Entleerung vorhandener Lipid-Vesikeln (RICE, 1986).

Die Produktionsraten an Progesteron lassen sich in batch-Kultur einfach bestimmen. Die Zunahme der Konzentration in Proben des Kulturmediumüberstands in einem definierten Zeitintervall entspricht der produzierten Menge im Intervall, bezogen auf das eingesetzte Kulturvolumen. Die Zellen produzieren Progesteron sowohl in der Wachstumsphase als auch in statischer Kultur bei Erreichen der Konfluenz und zwar 10^4 bis 10^5 Progesteronmoleküle pro Zelle pro Tag. Wie in Langzeitkulturexperimenten gezeigt werden konnte, bleibt die Produktion auch nach Konfluenz bis zu drei Monaten auf diesem hohen Niveau erhalten. Das Wachstums- und Produktionsverhalten ist einerseits zwischen parallelen Ansätzen einer Gewebepräparation gut vergleichbar und darüber hinaus bei gleichem Flächen/Volumen-Verhältnis in den verwendeten Kulturgefäßen von der Größe der Kultur unabhängig.

4.5 Bioreaktorentwicklung

Für die Kultur von Zellen kommen in der Biotechnologie eine Reihe von Bioreaktorkonzepten zum Einsatz, welche die klassischen Verfahren von T-Flaschen-, Roller- und Spinnerflaschenkulturen erweitern. Neben dem Rührkessel für Suspensionskulturen werden für adhärent wachsende Zellen Hohlfaser-, Wirbelschicht- und Festbettsysteme verwendet. Scherkräfteempfindliche Zellen werden in Hohlfaser- oder Festbettsystemen kultiviert. Hohlfaserreaktoren eignen sich besonders für Prozesse mit gezielter Produktrückhaltung oder Produktentfernung, die durch die Wahl des cutoffs der porösen Fasern gesteuert werden kann.

Für Scherkräfteunempfindliche Zellen bieten Wirbelschichtverfahren ideale Kulturbedingungen. Durch homogene, turbulente Durchmischung des gesamten Kulturvolumens gewährleistet das Verfahren ideale Sauerstoff- und Substratversorgung und damit eine Maximierung von Umsatzraten. Es lassen sich Partikelproben entnehmen sowie gemäß der Strategie des offenen, wachsenden Kultursystems die Partikeldichte und damit auch die Zelldichte sowie das Kulturvolumen variabel gestalten.

Je nach Fragestellung ergeben sich unterschiedliche Versorgungsstrategien mit dem Ziel, die Bereitstellung von Substraten, die Entfernung toxischer oder inhibierender Produkte oder die Verwertung des Kulturmediums zu optimieren. Die "Fütterung" der Kultur kann durch batch- oder fed-batch- (REHM ET AL., 1993), nutrient-split-Dialyse- (PÖRTNER ET AL., 1997) oder kontinuierlichen Betrieb (KEINER, 1991) erfolgen.

Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Bioreaktor ist von der Konzeption und technischen Ausführung für die Kultur der adhärent wachsenden Lutealzellen entwickelt und an ihre Wachstums- und Stoffwechselcharakteristik angepaßt worden.

Befinden sich die Zellen eines Organismus in einem größeren stationären Gewebeverband, so unterliegen ihre Stoffumsätze den Limitierungen der Versorgung mit Substraten, regulatorischen Faktoren sowie der Entsorgung inhibierender oder toxischer Produkte. Die Verfügbarkeit von Substraten wird unmittelbar in der extrazellulären Matrix durch Diffusion gewährleistet. Aufgrund der im Gewebe herrschenden Diffusionskoeffizienten ist eine effektive

Versorgung mittels Diffusion allerdings nur über wenige Millimeter möglich. Die höheren Wirbeltiere und insbesondere die Säugetiere verfügen über effiziente Verteilungssysteme und gewährleisten somit beachtliche Stoffumsatzraten bei relativ große Zellmassen. Ihre geschlossenen Kreislaufsysteme gewährleisten über die Perfusion von Blut über ein fraktal verzweigtes Gefäßsystem durch den gesamten Organismus mit einem im Verhältnis zur Körpermasse geringen Blutvolumen und niedrigem Energieaufwand des pumpenden Herzens. Außerdem verfügt das Kreislaufsystem über eine hervorragende Durchmischungscharakteristik: Bereits nach zwei Minuten ist z. B. beim Menschen eine intravenös applizierte Substanz gleichmäßig im Blut verteilt. Die statische Phase der Zellen in den Geweben wird durch die fluide Phase des Blutes über das feinverzweigte Blutgefäßsystem versorgt. Lediglich die kurze Distanz zwischen den feinsten Blutkapillaren und der Zielzelle wird durch Diffusionsprozesse bestimmt. Die Stoffumsätze in den Zellen unterliegen somit den Gesetzmäßigkeiten der heterogenen Katalyse (SERNETZ ET AL., 1985). Die maximalen Umsatzraten werden durch Diffusionsprozesse limitiert und es ist daher wichtig, zum einen die Diffusionsstrecken so klein wie möglich zu halten, zum anderen den Diffusionsgradienten und die Austauschoberflächen so groß wie möglich zu gestalten. In Kombination mit der Niere als Exkretionssystem gewährleistet das Kreislaufsystem die kontinuierliche Elimination von Produkten und Schadstoffen aus dem Blut.

Auch Bioreaktoren unterliegen den Gesetzmäßigkeiten der heterogenen Katalyse und müssen daher zur Erlangung maximaler Umsatzraten hinsichtlich des Versorgungssystems in analoger Weise optimiert werden. Der turbulent durchmischte Rührkessel (CSTR) für die Suspensionskultur aber auch der Wirbelschichtreaktor gewährleisten über Scherung von Kulturmedium als fluide Phase und den Zellen, bzw. den adhärent wachsenden Zellen auf dem suspendierten Trägermaterial als feste Phase einen optimalen Stoffaustausch. Ebenso können durch Trennung von Perfusionsmedium und Kulturmedium über großflächige Diffusionsmembranen leistungsfähige Bioreaktoren, wie Membran- oder Hohlfaserreaktoren konstruiert werden. Das Perfusionsmedium kann bei dieser Konstruktion mit beliebiger Turbulenz oder Geschwindigkeit an der Diffusionsfläche vorbeigeführt werden, ohne daß eine mechanische Beeinträchtigung der Zellen durch Scherkräfte an den Grenzflächen zu befürchten ist.

Der hier entwickelte Bioreaktor stellt von der Konzeption ein offenes System hinsichtlich des Wachstums und des Stoffwechsels proliferierender und produzierender Zellen dar, in dem sich im kontinuierlichen Betrieb ein Fließgleichgewicht einstellen kann. Er kombiniert in idealer Weise eine optimale Versorgung der Zellpopulation und gleichzeitig die Entfernung von Produkten und gewährleistet somit konstante Kulturbedingungen.

Im Vergleich mit anderen, diskontinuierlichen Kultursystemen simuliert der kontinuierlich betriebene Bioreaktor die in vivo Situation am besten und eignet sich daher in besonderem Maße zur Untersuchung organ- und zellphysiologischer Fragestellungen bei langen Kulturzeiten.

Die großen Kulturoberflächen, die sowohl im Hohlfaser- und Wirbelschichtbetrieb bereitgestellt werden können, ermöglichen bei insgesamt kleinen Kulturvolumina nahezu unbegrenztes Wachstum. Limitierungen in der Versorgung und eine Totraumbildung werden durch große Diffusionsoberflächen im Hohlfasermodul und durch turbulente Durchmischung der suspendierten Gelpartikeln im Wirbelschichtmodul vermieden.

Die Kulturflächen gewährleisten aufgrund ihrer mikrostrukturellen und chemischen Beschaffenheit eine gutes Adhärenz der Zellen. Die Hohlfasern bestehen aus regenerierter Cellulose und zeigen eine hohe Porosität (Abb. 4.8). Sie werden vor Inokulation der Zellsuspension zusätzlich mit Collagen beschichtet.

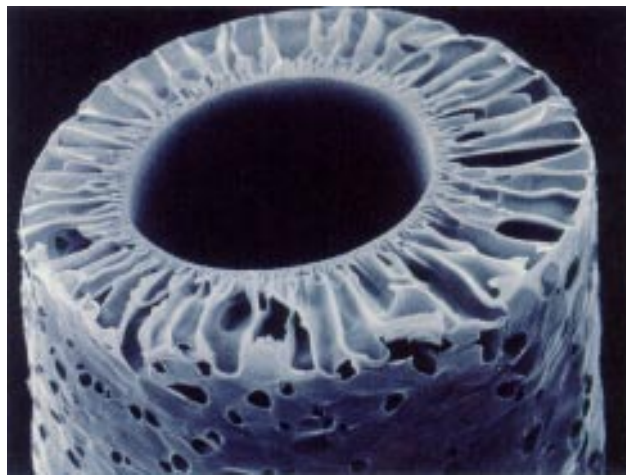


Abb. 4.8: Poröse Hohlfaser aus Cuprophan (regenerierte Cellulose) im Anschnitt
Durchmesser der Faser 100 μm , cutoff 10 kDa (REM-Aufnahme, aus MILLIPORE, 1998)

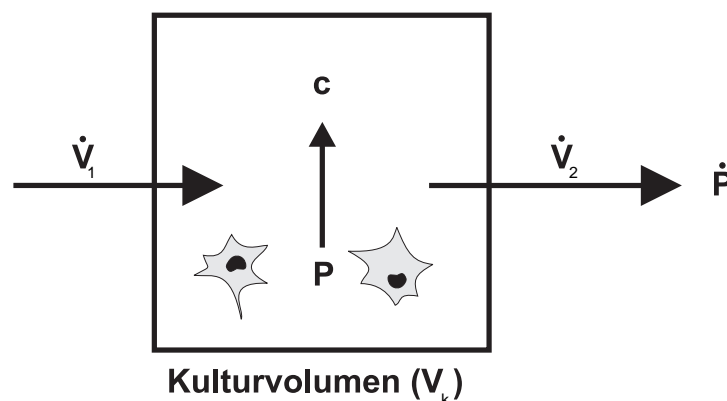
Die im Wirbelschichtmodul verwendeten Cytodex 3-Partikeln bestehen aus vernetztem Dextran und sind mit Collagen beschichtet. Durch permanente Suspendierung über die Gas-säule im Reaktor bieten sie ebenfalls ein optimales Milieu mit guter Sauerstoff- und Substratversorgung.

Für eine homogene Ansiedelung der Zellen auf den zur Verfügung stehenden Partikeln nach der Inokulation der Zellen mit der Partikelsuspension erschien allerdings ein periodisches Wechseln von Sedimentation und Suspendierung für günstiger, da eine permanentes Verwirbeln die Adhäsion der Zellen erschweren würde. Auch für den Betrieb des Wirbelschichtmoduls wurde intermittierende Rührung verwendet, denn trotz Silanisierung der Wandung des Kulturgefäßes zeigte sich nach mehrtägigem Betrieb eine Adhäsion von Partikeln. Die intermittierende Rührung führte zur Ablösung der anhaftenden Partikeln und unterstützte die permanente Verwirbelung durch die Gasblasen-Säule. Somit war über die gesamte Kulturdauer eine gute Suspendierung der Partikeln gewährleistet.

4.5.1 Kontinuierliche Kultur der Lutealzellen in Hohlfaser- und Wirbelschicht-Modulen

In einer batch-Kultur ist die Bestimmung der Produktionsraten an Progesteron einfach. Im Gegensatz dazu muß die Bilanz im kontinuierlichen Betrieb die Ausschwemmung an Produkt durch den Mediaustausch berücksichtigen. Unter Nutzung der Kinetik von Bioreaktoren in der Terminologie der Biotechnologie und völliger Analogie zu der in der Pharmakokinetik verwendeten Terminologie von Elimination und Clearance einer Substanz aus dem Körper, läßt sich der Effekt der Auswaschung durch die experimentell variierbare Verdünnungsrate auf den Konzentrationsverlauf einer im Bioreaktor produzierten Substanz beschreiben und berechnen. Befindet sich das System hinsichtlich der Produktkonzentration in einem stabilen Fließgleichgewicht und wird die Verdünnungsrate konstant gehalten, so entspricht die pro Zeiteinheit ausgewaschene Menge an Produkt der im System produzierten Menge.

Bei den durchgeführten Reaktorläufen im kontinuierlichen Betrieb ist aber der Verlauf der Progesteronkonzentration über die gesamte Kulturdauer und für die einzelnen Probenintervalle nicht konstant und damit die Berechnung der Produktionsraten so nicht direkt möglich. Unter Annahme einer mittleren konstanten Produktkonzentration in jedem Probenintervall kann allerdings die Abschätzung der Produktion unter Berücksichtigung der Elimination über eine Differenzenmethode abgeschätzt werden (Abb.4.9).



$$\text{Kulturvolumen } (V_k) \quad V_k = \text{const.} \quad (\dot{V}_1 = \dot{V}_2)$$

$$\text{Verdünnungsrate } (D) \quad D = \frac{\dot{V}}{V_k} \left[\frac{1}{d} \right]$$

$$\text{Produktionsrate } (\dot{P}) \quad \dot{P} \left[\frac{\text{mol}}{h} \right] = \frac{\Delta P}{\Delta t} = c_k \left[\frac{\text{mol}}{l} \right] * \dot{V}_2 \left[\frac{l}{h} \right]$$

Abb. 4.9: Produktion von Progesteron in einem Fließgleichgewicht unter konstanter Verdünnung

Bei konstantem Kulturvolumen (V_k), konstanter Verdünnungsrate (D) und konstanter Produktkonzentration (c_k) im Probenintervall läßt sich die Produktionsrate ($\Delta P/\Delta t$) im Intervall errechnen.

Die Produktionsrate entspricht der Menge am Produkt, die pro Intervall bei konstanter Verdünnungsrate ausgewaschen wird. Bei gegebener Verdünnungsrate wird die ausgespülte Menge an Produkt lediglich von der im Kulturvolumen vorhandenen Produktkonzentration bestimmt. Die Elimination erfolgt exponentiell nach einer Funktion 1. Ordnung.

Kultur der Lutealzellen in HF-Modulen

Die Zellpopulationen zeigten in allen Kulturexperimenten im Hohlfasersystem durchgehend hohe Progesteron-Produktionsraten. Es werden durchschnittlich 0,25 nmol Progesteron pro Tag produziert. Bezogen auf die Startzelldichte von 2×10^9 Zellen und ohne Beachtung der Zellproliferation während des Reaktorlaufs und somit konstanter Zelldichte im Kultursystem bedeutet es eine Produktion von 3 bis 6×10^{-21} mol Progesteron pro Zelle und Stunde. Dies entspricht immerhin einer Syntheserate von 100 bis 200 Progesteronmolekülen pro Zelle und Stunde.

Die sich durch Aufsummierung der in den Probenintervallen produzierten Mengen ergebende Gesamtproduktion betrug in den verschieden lang durchgeführten Kulturexperimenten 3,2 bis 8,7 nmol Progesteron. Die unterschiedlichen Verdünnungsraten von $D = 2/d$ und $D = 1/d$ haben auf die Produktionsraten im Hohlfasersystem keinen Einfluß.

Kultur der Lutealzellen in WS-Modulen

Im Wirbelschichtbetrieb ergaben sich unterschiedliche Produktionsraten an Progesteron von 0,17 bis 1,66 nmol pro Tag. Diese sind auf die unterschiedlichen eingesetzten Zellmengen und verwendeten Verdünnungsraten zurückzuführen, da für alle Experimente auf die gleiche Gewebepreparation zurückgegriffen werden konnte. Für die ersten beiden Läufe WS-1 und WS-2 wurden wie im Hohlfasersystem 2×10^9 Zellen verwendet. Für die Läufe WS-3 und WS-4 dagegen 3×10^9 Zellen. Die mittleren Produktionsraten betrugen für die Kultur mit 2×10^9 Zellen 0,23 nmol/d und für 3×10^9 Zellen 1,29 nmol/d. Die Vergrößerung der eingesetzten Zellmenge um 50 % führte zu einer Erhöhung der mittleren Produktion um das 5 bis 6-fache. In den Kulturexperimenten wurden insgesamt 2,9 bis 25,1 nmol Progesteron produziert. Die Reduktion der Verdünnungsrate von $D = 1/d$ auf 0,5/d und schließlich 0,33/d hat zu unterschiedlichen Produktionsraten geführt.

Die Kultur im Wirbelschicht-Bioreaktor zeigt hinsichtlich einer möglichen mechanischen Belastung der Zellen über die turbulente Durchmischung des Kulturvolumens gegenüber der Hohlfaserkultur keine Nachteile. Die Lutealzellen sind somit für die Kultur im Wirbelschichtverfahren geeignet.

Die batch-Kultur für 72 Stunden hatte keinen negativen Einfluß auf die Lutealzellpopulation; sie kann in bezug auf die Progesteron-Produktion sogar als förderlich bezeichnet werden.

Der Start im batch-Betrieb und die geringen Verdünnungsraten von $D = 0,33/d$ gewährleisteten eine für die Lutealzellen in der vorgegebenen Dichte ausreichende Substratversorgung. Die damit verbundene geringere Ausschwemmung von Produkten und

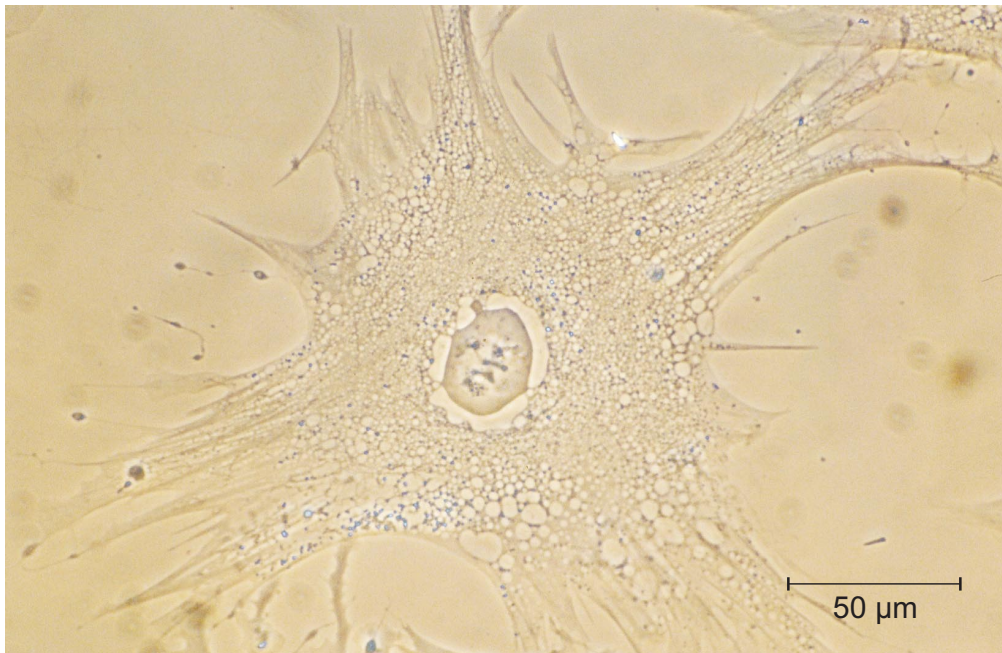


Abb. 4.10: Lutealzelle auf collagenisiertem Glasträger nach 28 Tagen in Kultur und 24 h nach Induktion der Apoptose durch 10 mg/l $\text{PGF}_{2\alpha}$

Die Zelle bekommt eine vielstrahlige Gestalt. Das Zytoplasma ist zusammengezogen und wirkt durch starke Vakuolisierung löchrig. Um den Kern herum bildet sich ein Ring von großen Vakuolen aus. Diese Zellen produzieren kein Progesteron mehr.

Stoffwechselmetaboliten sowie von autokrin wirkenden Faktoren, welche die Lutealzellen zu einer gegenseitigen Stimulation in das Medium abgegeben haben, führte zu einer insgesamt höheren Produktionsrate.

In den Reaktorläufen WS-3 und WS-4 konnte nach längerer Kultur im kontinuierlichen Betrieb die Inhibierbarkeit der Lutealzellfunktion untersucht werden. Der luteolytische Effekt des Prostaglandins $\text{F}_{2\alpha}$ wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen von 1 und 10 mg/l Kulturvolumen getestet. Unter dem Einfluß von 1 mg/l des $\text{PGF}_{2\alpha}$ zeigte sich keine deutliche Abnahme der Produktionsraten. Nach Kultur mit einer mittleren Produktionsrate von 1,66 nmol/d zeigte sich hingegen unter 10 mg/l $\text{PGF}_{2\alpha}$ ein sofortiger Stop mit einem durch die Verdünnungsrate gegebenen exponentiellen Abfall auf schließlich 0,7 nmol/d.

Diese Ergebnisse stimmen mit den durchgeführten Inhibitionsexperimenten in der Langzeitkultur im Multiwell-Kultursystem überein. Auch dort liegt die biologische Wirksamkeit des luteolytischen $\text{PGF}_{2\alpha}$ zwischen 1 und 10 mg/l. Diese Konzentrationen stimmen mit Literaturdaten zur Untersuchung der Prostaglandin-induzierten Apoptose beim Rind in vitro überein (Alila et al., 1988).

Die Untersuchung des Einflusses des Prostaglandins auf die Lutealfunktion ist somit auch in der Zellkultur experimentell und quantitativ möglich und ein Indiz für die Inhibierbarkeit der Zellen in vitro (Abb. 4.9). Neben der anhaltenden Fähigkeit zur Produktion von Progesteron stellt sie ein Maß zur Abschätzung der Höhe des Differenzierungsgrades der Primärzellen in Kultur dar.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Bioreaktor eignet sich sehr gut sowohl mit dem verwendeten Hohlfaser-System als auch im Wirbelschichtverfahren für die Kultur der Lutealzellen. Im Wirbelschichtreaktor ergeben sich nach Start im batch-Betrieb für 72 h und anschließender Umschaltung auf kontinuierlichen Austausch des Mediums mit geringer Verdünnungsrate von $D = 0,33/d$ die besten Kulturbedingungen.

Auch wenn die Zahl der bisher durchgeführten Kulturversuche im kontinuierlichen Bioreaktor begrenzt ist, liefern sie gute Hinweise auf die Eignung des Kultursystems und zeigen die prinzipielle Möglichkeiten der Untersuchung endokriner Funktion an einem isolierten Zelltyp in einem kontinuierlichen in vitro-System. Der vorgestellte Bioreaktor bietet die Chance, zelluläre Mechanismen und Organfunktionen, hier endokrine Funktion, Stimulation und Hemmung, isoliert und über längere Zeiträume unter definierten konstanten Bedingungen zu untersuchen. Übergeordnete Regulationmechanismen, wie sie in vivo die Analyse zellulärer oder organphysiologischer Funktionen beeinflussen, überlagern und erschweren können, entfallen in einem solchen System.

Durch gezieltes Variieren der Kulturbedingungen im technischen System des Bioreaktors läßt sich eine spezifische Stoffwechselleistung manipulieren und in bezug auf eine spezifische Produktion optimieren. Die Produktionsleistung der Zellen wiederum stellt ein Maß für die Güte der biotechnologischen Prozeßführung dar.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Langzeitkultur endokrin aktiver Primärzellen aus dem bovinen Corpus luteum etabliert. Dafür wurde ein kontinuierlicher Bioreaktor in modularer Bauweise entwickelt, in dem Lutealzellen auf Hohlfasern oder trägergebunden im Wirbelschichtverfahren kultiviert werden konnten. In klassischer Kultur sowie im Bioreaktor konnte die Progesteronproduktion der Lutealzellen über einen Zeitraum bis zu 119 Tagen untersucht und nachgewiesen werden.

Aufbauend auf den in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Präparation und Kultur von primären Ovarial- und Lutealzellen sowie Leberzellen verschiedener Säugetiere wurden Methoden entwickelt, die es ermöglichten, Lutealzellen des Rindes in Kultur zu nehmen, sie über einen Zeitraum von mehreren Monaten zu kultivieren und ihre Progesteronproduktion in vitro nachzuweisen. Die Progesteronproduktion diente als Maß der Funktionsfähigkeit und damit der Vitalität der Lutealzellen. Durch Variation der verwendeten Kulturmedien und Mediensupplemente wurde die Kultur hinsichtlich der Produktionsrate an Progesteron optimiert. Durch Zugabe des luteotropen Hormons hCG ließ sich die Progesteronsynthese stimulieren.

Es wurde ein kontinuierlich betriebender Bioreaktor entwickelt und auf die Erfordernisse der Kultur von Lutealzellen abgestimmt. Seine modulare Konzeption ermöglichte den wahlweisen Einsatz verschiedener Kulturverfahren, wie Hohlfaser-, Wirbelschicht- oder Festbettkultur. Der Bioreaktor umfaßt neben den Kulturmodulen ein Perfusionssystem zur Versorgung mit Sauerstoff und Kohlendioxid. Über den kontinuierlichen Austausch des Kulturmediums ist eine optimale Versorgung mit Substraten sowie Entsorgung von Produkten und potentiell inhibitorisch oder toxisch wirkenden Metaboliten gewährleistet. Eine PC-gestützte Prozeßkontrolle ermöglichte die Aufnahme von Meßwerten über Sensoren, die Chemostatisierung der Kultur über Regelalgorithmen und die Protokollierung der Prozeßdaten.

Primäre Lutealzellen konnten im modularen kontinuierlichen Bioreaktor im Hohlfaser- sowie im Wirbelschichtbetrieb bis zu drei Wochen erfolgreich kultiviert und die Produktion von Progesteron über die gesamte Kulturdauer nachgewiesen werden. Durch Zugabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$, einem beim Rind luteolytisch wirkenden Gewebshormon, war es möglich, die Progesteronproduktion definiert zu inhibieren.

6 Summary

This thesis presents long-term culture of primary bovine luteal cells using conventional cell-culture techniques and bioreactors. Aimed at the evaluation of bovine luteal cell characteristics a continuous bioreactor in modular conception was developed using commercial hollow-fiber modules as well as a self-designed fluidized-bed module for suspended microcarriers. Progesterone production of luteal cells was successfully assayed for about 119 days in vitro.

At first, long-term culture and characterization of primary bovine luteal cells is described. Preparation and cultivation are based on common protocols for ovarian cells, luteal cells and hepatocytes of different mammals. Progesterone production rate is used to describe cell vitality and luteal function in-vitro. The production of progesterone is optimized by varying culture conditions, cell-culture media and medium-supplements and was stimulated under gonadotropine hCG treatment.

The bioreactor was developed in a modular concept for the use of different culture methods. Hollow-fiber and tank-reactor modules, using fluidized-bed techniques with suspended microcarriers or fixed-bed techniques with porous macrocarriers provided ideal conditions for growth of adherent cells. Optimum oxygen and carbondioxide uptake are provided by a regulated perfusion-system enabling distinct oxygen concentration and pH-value. The continuous medium-exchange provides defined and optimized supply of substrates and removal of products, inhibitors or toxic factors. The online acquisition of sensor data, the chemostat controlling and the storage of process data was realized by a PC-based process control.

Primary luteal cells were cultured in a continuous bioreactor using hollow-fiber and fluidized-bed modules and progesterone production was assayed for about 21 days.

Using the luteolytic factor prostaglandin F_{2a} , defined inhibition of progesterone production could be demonstrated.

7 Literatur

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M. ROBERTS, K. UND WATSON, J.D. (EDS.):
Molekularbiologie der Zelle.
Kap. 13.3.2 f.f., 2. Auflage, dt. Übers. Jaenicke, L. (Hrsg.), VCH Verlagsgesellschaft mbH,
Weinheim, 1990

ALILA, H.W. AND HANSEL, W.:
Origin of Different Cell Types in the Bovine Corpus Luteum as Characterized by Specific
Monoclonal Antibodies.
Biology of Reproduction **31**(5):1015-25, 1984

ALILA, H.W., DOWD, J.P., CORRADINO, R.A., HARRIS, W.V. AND HANSEL, W.:
Control of Progesterone Production in Small and Large Bovine Luteal Cells Separated by
Flow Cytometry.
J. Reproduction and Fertility **82**: 645-655, 1988

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH:
Percoll Methodology and Application.
Firmenbroschüre, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, 1995

BARBEHENN, E.K., MASTERSON, E., KOH, S.-W., PASSONNEAU, J.V. AND CHADER, G.J.:
An Examination of the Efficiency of Glucose and Glutamine as Energy Sources for
Cultured Chick Pigment Epithelial Cells.
J. Cellular Physiology **118**: 2262-266, 1984

BARNES, D. AND SATO, G.:
Methodes for Growth of Cultured Cells in Serum-Free Medium.
Analytical Biochemistry **102**: 255-270, 1980

BERTOLOTTI, R.:
A Selective System for Hepatoma Cells Producing Gluconeogenic Enzymes.
Somatic Cell Genetics **3** (365), 1977

BRADFORD, M.M.:
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein
Utilizing the Principle of Protein-dye Binding.
Analytical Biochemistry **72** (248), 1976

BUTLER, M.:

Mammalian Cell Biotechnology. A Practical Approach.

KAP. 6, OXFORD UNIVERSITY PRESS, OXFORD, 1991

CARROLL, P.J. GRUMMER, R.R. AND MAO, F.C.:

Progesterone Production by Cultured Luteal Cells in the Presence of Bovine Low- and High-density Lipoproteins Purified by Heparin Affinity Chromatography.

J. Animal Science **70**: 2516-2526, 1992

CARRASCO, I., TRONCOSO, J.L., DEVOTO, L. AND VEGA, M.:

Differential Steroidogenic Response of Human Luteal Cell Subpopulations.

Human Reproduction **11** (8): 1609-1614, 1996

DAVIS, J.S., WEST, L.A., WEAKLEAND, L.L., FARESE, R.E., WEST, L.A.:

Human Chorionic Gonadotropin Activates the Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Ca²⁺ Intracellular Signalling System in Bovine Luteal Cells.

Proc. National Academy of Science **84**: 3728-3732, 1986

DAVIS, J.S. MAY, J.V. AND KEEL, B.A.:

Mechanisms of Hormone and Growth Factor Action in the Bovine Corpus Luteum.

Theriogenology **45** (7), 1996

DEL VECCHIO, R.P., SUTHERLAND, W.D. AND SASSER, R.G.:

Prostaglandin F_{2α}, Progesterone and Oxytocin Production by Cultured Bovine Luteal Cells Treated with Prostaglandin E₂ and Pregnancy-Specific Protein B.

Prostaglandins **50**: 137-150, 1995

DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B. AND NEWELL D.G. (EDS.):

Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures

John Wiley & Sons 1995

DSMZ:

Catalogue of Human and Animal Cell Lines.

Firmenbroschüre, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, 1998

DULBECCO, R. AND FREEMAN, G.:

Plaque Formation by the Polyoma Virus.

Virology **8**: 396-397, 1959

DWORKIN, M. B. AND DWORKIN-RASTL, E.:

Carbon Metabolism in Early Amphibian Embryos.

TIBS **16**: 229-234, 1996

EAGLE, H.:

Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures.

Science **130** (432), 1955

EIGENBRODT, E., GERBRACHT, U., MAZUREK, S., PRESEK, P. AND FRIIS, R.:

Carbohydrate Metabolism and Neoplasia: New Perspectives for Diagnosis and Therapy.

In: Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers, Vol. 2 Academic Press, 1994

FIELDS, M.J., BARROS, C.M., WATKINS, W.B. AND FIELDS, P.A.:

In Vivo Effect of PGF_{2α} on Bovine Large Luteal Cell Secretory Granules and their Content, Oxytocin and Neurophysin.

Biology of Reproduction **44** (100), 1991

FIELDS, M.J. AND FIELDS, P.A.:

Morphological Characteristics of the Bovine Corpus Luteum During the Estrous Cycle and Pregnancy.

Theriogenology **45** (7), 1996

FISHER, T.V. AND KAHN, R.H.:

Histochemical Studies of Rat Ovarian Follicular Cells In Vitro.

In Vitro **7** (4), 1972

FRESHNEY, R.I.:

Tierische Zellkultur.

Walter de Gruyter & Co., New York, Berlin, 1990

FURMAN, A., ROTMENSCH, S., KOHEN, F., MASHIACH, S. AND AMSTERDAM, A.

Regulation of Rat Granulosa Cell Differentiation by Extracellular Matrix Produced by Bovine Corneal Endothelial Cells.

Endocrinology **118** (5), 1986

GAWLITZEK, M., VALLEY, U. AND WAGNER, R.:

Ammonium Ion and Glutamine Dependent Increases of Oligosaccharide Complexity in Recombinant Glycoproteins Secreted from Cultivated BHK-21 Cells.

Biotechnology and Bioengineering **5**, 57 (5): 518-528, 1998

GAWLITZEK M., VALLEY, U., NIMTZ, M, WAGNER, R. AND CONRADT, H.S.:
Charakterization of Changes in the Glycosylation Pattern of Recombinant Proteins from
BHK-21 Cells due to Different Culture Conditions.

J. Biotechnology **29**, 42 (2): 117-131, 1995

GAWLITZEK M., PAPAC, D.I. SLIWKOWSKI, M.B. AND RYLL, T.:
Incorporation of ^{15}N from Ammonium into the N-linked Oligosaccharides of an
Immunoadhesin Glycoprotein Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells.

Glycobiology **9** (2): 125-31, 1999

GERLACH, J.C.:

Development of a Hybrid Liver Support System: A Review.

Int. J. Artificial Organs **19** (11): 645-54, 1996

GERRES, S.:

Untersuchungen zur Bedeutung von Progesteron als Regelfaktor bei der Entstehung der
Pseudogravidität der Hündin.

Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1991

GREGORASZCZUK, E. AND WOJTUSIAK, A.:

Histochemical Evaluation of $\Delta^5\beta$ -HSD Activity in Two Types of Porcine Corpora Lutea
and Granulosa Cells in Tissue Culture.

Acta Histochemica **70**: 22-30, 1982

GU, Y. AND GIBORI, G.:

Isolation, Culture and Characterization of the Two Cell Subpopulations Forming the Rat
Decidua: Differential Expression for Activin, Follistatin, and Decidual Prolactin-related
Protein.

Endocrinology **136** (6), 1995

HANSEL, W. AND DOWD, J.P.:

New Concepts of the Control of Corpus luteum Function. Hammond Memorial Lecture.

J. Reproduction and Fertility **78** (2): 755-68, 1986

HAUGHLAND, R.P.:

Conjugation with Amine-Reactive Probes.

in: Handbook of Fluorescent Probes and Chemicals.

Firmenbroschüre, Molecular Probes Inc., 1996

HELSEL, R.:

HP VEE: Grafische Programmierumgebung für Test- und Meßtechnik.

Prentice Hall Verlag GmbH, München, 2. Aufl., 1997

HINSHELWOOD, M.M. DEMETER-ARLOTTO, M., MEANS, G.D. AND SIMPSON, E.R.:

Molecular Biology of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes in the Ovary.

In: Adashi, E.Y. and Leung, P.C.K. (Eds.): The Ovary, Plenum Press, New York, 1993

HOFFMANN, B. SCHAMS, D., BOPP, R., ENDER, M.L. GIMENEZ, T. AND KARG, H.:

Luteotrophic Factors in the Cow: Evidence for LH rather than Prolactin.

J. Reproduction and Fertility **40**: 77-85, 1974

HOFFMANN, B., KYREIN, H.J. AND ENDER, M.L.:

An Efficient Procedure for the Determination of Progesterone by Radioimmunoassay

Applied to Bovine Peripheral Plasma.

Hormone Research **4**: 302-310, 1973

HOLLENBERG, M.D. AND CUATRECASAS, P.:

Epidermal Growth Factor: Receptor in Human Fibroblasts and Modulation of Action by Cholera Toxin.

Proc. National Academy of Science **70**: 1964-2968, 1973

JUENGEL, J.L., GARVERICK, H.A., JOHNSON, A.L., YOUNGQUIST, R.S. AND SMITH, M.F.:

Apoptosis During Luteal Regression in Cattle.

Endocrinology **132** (1), 1993

KEINER, K.:

Analyse der Sauerstoff-Umsatzrate und dispersive, impulszytometrische Bestimmung der Zelldichte an einem kontinuierlichen Zellreaktor mit suspendierten Säugerzellen.

Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1991

KOEBE, H.-G., PAHERNIK, S., EYER, P. AND SCHILDBERG, F.-W.:

Collagen Gel Immobilization: A Useful Cell Culture Technique for Long-term Metabolic Studies on Human Hepatocytes.

Xenobiotica **24** (2): 95-107, 1994

LANGANGER, G., DE MEY, J. UND ADAM, H.:

1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-Oktan (DABCO) verzögert das Ausbleichen von Immun-fluoreszenzpräparaten.

Mikroskopie (Wien) **40**: 237-241, 1983

LAPTHORN, A.J. HARRIS, D.C., LITTLEJOHN, A., LUSTBADER, J.W., CANFIELD, R.E., MACHIN, K.J., MORGAN, F.J. AND ISAACS, N.W.:

Crystal Structure of Human Chorionic Gonadotropin.

Nature **369** (9), 1994

LINDL, T. UND BAUER, J.:

Zell- und Gewebekultur.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1987

LUSTBADER, J.W., WU, H., BIRKEN, S., POLLAK, S., GAWINOWICZ KOLKS, M.A., POUND, A.M., AUSTEN, D., HENDRICKSON, W.A. AND CANFIELD, R.E.:

The Expression, Characterization, and Crystallization of Wild-type and Selenomethyl human chorionic gonadotropin.

Endocrinology **136** (2): 640-650, 1995

KANUKA, H., MATSUYAMA, S., ONISHI, M. MATSUMOTO, Y., NISHIHARA, M.
AND TAKAHASHI, M.:

Prolactin Expresses Differential Effects on Apoptotic Cell Death of Luteal Cells In Vivo and In Vitro.

Endocrine J. **44** (1): 11-22, 1997

MAGOFFIN, D.A. AND ERICKSON, G.F.:

Purification of Ovarian Theca-Interstitial Cells by Density Gradient Centrifugation.

Endocrinology **122** (5), 1988

MAZUREK, S. MICHEL, A. AND EIGENBRODT, E.:

Effect of Extracellular AMP on Cell Proliferation and Metabolism of Breast Cancer Cell Lines with High and Low Glycolytic Rates.

J. Biological Chemistry **272** (8): 4941-4952, 1997

MAZUREK, S. BOSCHEK, C.B. AND EIGENBRODT, E.:

The Role of Phosphometabolites in Cell Proliferation, Energy Metabolism, and Tumor Therapy.

J. Bioenergetics and Biomembranes, **29** (4), 1997

MCLEAN, J.S., FRAME, M.C., FRESHNEY, R.I., VAUGHAN, P.F.T., MACKIE, A.E.:

Phenotypic Modification of Human Glioma and Non-Small Cell Lung Carcinoma by Glucocorticoids and other Agents.

Anticancer Research **6**: 1101-1106, 1986

McNAMARA, B.C., CRANNA, E.G. BOOTH, R. AND STANSFIELD, D.A.:

The Preparation and Purification of Isolated Rat Corpus-luteum Cells and their Use in Studying the Relationship between Cholesterol Biosynthesis and their Lutropine-stimulated Formation of Progesterone.

Biochemistry J. **192**: 559-567, 1980

MENZEL, K.D. BIERMANN, A. UND DRIESCH, D.:

Untersuchung zur kLa-Bestimmung mit der Ausgasungsmethode.

Bioforum **12**: 777-782, 1998

MILLER, J.B. AND OBASIOLU, C.:

The Effect of Insulin and Insulin-like Growth Factors on Luteal Progesterone Secretion in the Rabbit.

J. Society of Gynecological Investigation **3** (5): 262-266, 1996

MILLIPORE:

Firmenbroschüre zu Hohlfasermodulen für Zellkultur und Ultrafiltration, 1998

MILVAE, R.A., ALILA, H.W., BUSHMICH, S.L. AND HANSEL, W.:

Bovine Corpus Luteum Function after Removal of Granulosa Cells from the Preovulatory Follicle.

Domestic Animal Endocrinology **8** (3): 439-443, 1991

MORTON, H.J.:

A Survey of Commercially Available Tissue Culture Media.

In Vitro **6**: 89-109, 1970

NELSON, S.E., MCLEAN, M.P., JAYATILAK, P.G. AND GIBORI, G.:

Isolation, Characterization, and Culture of Cell Subpopulations Forming the Pregnant Rat Corpus Luteum.

Endocrinology **130** (2), 1992

NYBERG, S.L., HIBBS, J.R., HARDIN, J.A., GERMER, J.J. AND PERSING, D.H.:

Transfer of Porcine Endogenous Retrovirus Across Hollow Fiber Membranes: Significance to a Bioartificial Liver.

Transplantation **15**, 67 (9): 1251-1255, 1999

OH, NAM-SOON:

Entwicklung und reaktionskinetische Analyse des Umsatzes eines kontinuierlichen mikrobiellen Bioreaktors mit der Bildung von L-Lysin.

Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1993

ORLY, J., WEINBERGER-OHANA, P. AND FARKASH, Y.:

Studies on Regulation of Ovarian Steroidogenesis in Vitro.

In: Hormonally Defined Media. Fischer, G. and Wieser, R.J. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1982

O'SHAUGHNESSY, P.J. AND WALTHES, D.C.:

Characteristics of Bovine Luteal Cells in Culture: Morphology, Proliferation and Progesterone Secretion in Different Media and Effects of LH, Dibutyl Cyclic AMP, Antioxidants and Insulin.

J. Endocrinology **104** (3): 355-361, 1985

O'SHEA, J.D. RODGERS, R.J. AND OCCHIO, M.J.:

Cellular Composition of the Cyclic Corpus luteum of the Cow.

J. Reproduction and Fertility **85** (2): 483-487, 1989

O'SHEA, J.D., RODGERS, R.J., MCCOY, K. AND OCCHIO, M.J.:

Ultrastructural Cytology of the Cyclic Corpus luteum of the Cow.

Acta Anatomica (Basel) **138** (2): 154-165, 1990

PEARSE, A.G.E.:

Histochemistry.

Vol. III, Churchill Livingstone, Edinburgh, New York, 1985

PETRAUSCH, L.:

Das Lexikon der Tierarzneimittel.

12. Auflage, Delta Medizinische Verlagsgesellschaft mbH Berlin, 1997

PÖRTNER, R., LÜDEMANN, I. AND MÄRKL, H.:

Dialysis Cultures with Hybridoma Cells for Effective Production of Monoclonal Antibodies.

Cytotechnology **23**: 39-45, 1997

RAAB, M.:

Entwicklung eines Meß- und Versorgungssystems zur Ermittlung des Sauerstoffumsatzes an einem analytischen, kontinuierlichen Zellreaktor.

Diplomarbeit FH Gießen-Friedberg 1988

- REHM, H.J., REED., G., PÜHLER, A. AND STADLER, P. (EDS.):
Biotechnology. Vol. 3, Bioprocessing (Stephanopoulos, G., Ed.).
VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1993
- REITZER, L.J., WICE, B.M. AND KENNEL, D.:
Evidence that Glutamine, not Sugar, is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells.
J. Biological Chemistry **254**: 2669-2677, 1979
- RICE, G.E., JENKIN, G. AND THORBURN, G.D.:
Comparison of Particle-associated Progesterone and Oxytocin in the Ovine Corpus Luteum.
J. Endocrinology **108**: 109-116, 1986
- ROMEIS, B.:
Mikroskopische Technik.
Urban und Schwarzenberg Verlag, München, 17. Auflage, 1989
- RUEDA, B.R., WEGNER, J.A., MARION, S.L., WAHLEN, D.D., HOYER, P.B.:
Internucleosomal DNA Fragmentation in Ovine Luteal Tissue Associated With Luteolysis:
In Vivo and In Vitro Analysis.
Biology of Reproduction **52**: 305-312, 1995
- RÜSSE, I. UND SINOWATZ, F.:
Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1991
- RYLL T, WAGNER R:
Improved Ion-pair High-performance Liquid Chromatographic Method for the
Quantification of a Wide Variety of Nucleotides and Sugar-nucleotides in Animal Cells.
J. Chromatography **18**, 570 (1): 77-88, 1991
- SANDERS, S.L. AND STOUFFLER, R.L.:
Gonadotropine- and Lipoprotein-supported Progesterone Production by Primate Luteal
Cell Types in Culture.
Endocrine **3**: 169-175, 1995
- SERNETZ, M., GELLÉRI, B AND HOFMANN, J.:
The Organism as Bioreactor. Interpretation of the Reduction Law of Metabolism in Terms
of Heterogeneous Catalysis and Fractal Structure.
J. Theoretical Biology **117**: 209-239, 1985

SMOLLIICH, A. UND MICHEL, G.:

Mikroskopische Anatomie der Haustiere.

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 1992

SPICER, L.J. AND STEWART, R.E.:

Interactions among Basic Fibroblast Growth Factor, Epidermal Growth Factor, Insulin and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) on Cell Numbers and Steroidogenesis of Bovine Thecal Cells: Role of IGF-1 Receptors.

Biology of Reproduction **54**: 255-263, 1996

VOET, D. UND VOET, J.G.:

Biochemie.

Kap. 23.6, dt Übers.: Maelicke A. und Müller-Esterl, Eds., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 1992

WOODRUFF, T.K., BATTAGLIA, J., BOWDIDGE, A., MOLSKNESS, T.A., STOUFFER, R.L., CATALDO, N.A., GIUDICE, L.C., ORLY, J. AND MATHER, J.P.:

Comparison of Functional Response of Rat, Macaque, and Human Ovarian Cells in Hormonally Defined Medium.

Biology of Reproduction **48**: 68-76, 1993

ZACHOW, R.J. AND TERRANOVA, P.F.:

The Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Luteinizing Hormone (LH)- / Insulin-like Growth factor-I (IGF-I)-regulated Androstenedione Biosynthesis and IGF-I Directed LH Receptor Number in Cultured Theca-interstitial Cells.

Endocrine **2**: 1145-1150, 1994

ZHENG, J., FRICKE, P.M., REYNOLDS, L.P. AND REDMER, D.A.:

Evaluation of Growth, Cell Proliferation, and Cell Death in Bovine Corpora lutea throughout the Estrous Cycle.

Biology of Reproduction **51**: 623-632, 1994

Verpflichtungserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt,
daß ich die vorliegende Arbeit selbständig ausgeführt
und keine anderen als die genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Lebenslauf

Vorname: Christoph
Nachname: Giese
geboren: 05.03.1968 in Ehringshausen (Lahn-Dill-Kreis)
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang

1974 - 1978 Besuch der Grundschule Rechtenbach
1978 - 1984 Besuch der Gesamtschule Schwingbach, Erwerb der Mittleren Reife
1984 - 1987 Besuch der Gymnasialen Oberstufe, Goetheschule Wetzlar, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife, Gesamtnote 1,9
1987 - 1988 Wehrdienst bei der Bundeswehr

Beruflicher Werdegang

1988 - 1995 Studium der Biologie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, Gesamtnote "sehr gut"
1993 - 1995 Diplomarbeit am Zentrum der Rechtsmedizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main in der AG von Prof. Dr. D. Mebs
- Thema: "Untersuchungen zur Biochemie und Ökologie von Toxinen mariner Anthozoa"
- Schwerpunkte: Proteinreinigung und Charakterisierung, Toxizitäts-Screening, Histologie, meeresbiologische Feldarbeit
1994 3 monatiger Forschungsaufenthalt am Discovery Bay Marine Laboratory (University of the West Indies, Kingston)
seit 1995 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bei Prof. Dr. M. Sernetz, Betreuung des Arbeitsgebietes "Zellkultur und Bioreaktoren"

Publikation:

GIESE, C., MEBS, D. UND WERDING, B.:

Resistance and Vulnerability of Crustaceans to Cytolytic Sea Anemone Toxins.

Toxicon **34** (8): 955-958, 1996

Danksagungen

Ich danke

Prof. Dr. Manfred Sernetz für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die intensiven und anregenden Fachgespräche

Prof. Dr. Wolfgang Clauß vom Tierphysiologischen Institut des Fachbereichs Biologie für die Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Biologie

Frau Daniela Hild für die Unterstützung bei Arbeiten in der Zellkultur, beim Betrieb des Bioreaktors und der Durchführung der cytologischen Assays

Herrn Gerd Herber für technische Unterstützung und für die Anfertigung von Reaktorbauteilen

Prof. Dr. Bernd Hoffmann und Dr. Gerhard Schuler an der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie des Fachbereichs Veterinärmedizin für die Progesteronbestimmungen mittels RIA sowie für die Beratung zur Endokrinologie des Gelbkörpers

Dr. Hubertus Hipke und Dipl.-Biol. Elmar Schröpfer vom Tierphysiologischen Institut des Fachbereichs Biologie für die Nutzung des konfokalen Laserscan-Mikroskops

Frau Dr. Ursula Richter, Zentrale Biotechnische Betriebseinheit (ZBB) am Strahlencentrum, für die Anfertigung von REM-Aufnahmen

Prof. Dr. Eberhard Burkhardt vom Institut für Veterinär-Pathologie des Veterinärklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Anfertigung der REM-Präparate und für REM-Aufnahmen

Anhang I

Verwendete Abkürzungen

A.D.	Außendurchmesser
A. dest.	Aqua destillata
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CG	Choriongonadotropin
CL	Corpus luteum
CSSE	Cholesterin-Seitenketten-spaltendes Enzym
CSTR	Continuous Stirred Tank Bioreactor, kontinuierlich und turbulent durchmischter Rührkesselreaktor
DABCO	1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-Oktan
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-MEM	Minimal-Essential-Medium, Modifizierung nach Dulbecco
EC	Endothelial Cell, Endothelzelle
EKV	Extrakapilläres Volumen
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Gn-RH	Gonadotropin Releasing-Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HF-Modul	Hohlfasermodule
I.D.	Innendurchmesser
IKV	Intrakapilläres Volumen
KV	Kulturvolumen
LH	Luteinisierendes Hormon
LLC	Large Luteal Cell, große Lutealzelle
w/v	weight per volume, Konzentration als Gewicht pro Volumen
NBT	Nitroblue-Tetrazolium
MEM-E	Minimal-Essential-Medium, Modifizierung nach Eagle
PBS	Phosphat Buffered Saline, isotonischer Phosphatpuffer
PBS-Amph	Amphotericin B-haltiger, isotonischer Phosphatpuffer
PBS-Ca	Isotonischer Phosphatpuffer mit Ca ²⁺ -Supplementierung
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
REM	Raster-Elektronenmikroskopie
SDS	Sodium Dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SLC	Small Luteal Cell, kleine Lutealzelle

TCA	Trichloroacetic acid, Trichloressigsäure
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (1,2-bis[Dimethylamino]ethan)
TRIS-HCl-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan-Puffer (pH mit HCl eingestellt)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	volume per volume, Konzentration als Volumen pro Volumen
WS-Modul	Wirbelschichtmodul

Anhang II

Rezepturen für Medien und Lösungen

Verwendete Zellkulturmedien:

(die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das unsupplementierte Medium gemäß den Herstellerangaben)

Komponenten	MEM-E (Sigma, M 5650)	D-MEM (PAA, E 15-806)
Anorganische Salze	[mg/l]	[mg/l]
CaCl ₂	265,00	200,00
Fe(NO ₃) ₃ ·9 H ₂ O	-	0,10
KCl	400,00	400,00
MgSO ₄ (Anhydrat)	97,67	97,70
NaCl	6.800,00	6.400,00
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	125,00
NaH ₂ PO ₄ (Anhydrat)	122,00	-
NaHCO ₃	2.000,00	3.700,00
Aminosäuren		
L-Alanin	8,90	-
L-Arginin-HCl	126,00	84,00
L-Asparagin-H ₂ O	15,00	-
L-Aspartat	13,30	-
L-Cystein-2HCl	31,30	62,57
L-Glutamin	292,00	584,00
L-Glutamat	14,70	-
Glycin	7,50	30,00
L-Histidin-HCl·H ₂ O	42,00	42,00
L-Isoleucin	52,00	-
L-Leucin	52,00	104,80
L-Lysin-HCl	72,50	104,80
L-Methionin	15,00	146,20
L-Phenylalanin	32,00	30,00
L-Prolin	11,50	-
L-Serin	10,50	66,00
L-Threonin	48,00	42,00
L-Tryptophan	10,00	95,20
L-Tyrosin-2 Na-2 H ₂ O	51,90	16,00
L-Valin	46,00	103,79
Vitamine		
D-Ca-Pantothenat	1,00	94,00
Cholinchlorid	1,00	4,00
Folsäure	1,00	4,00
i-Inositol	2,00	7,20
Niacinamid	1,00	-
Nicotinamid	-	4,00
Pyridoxin	1,00	0,40
Riboflavin-HCl	-	4,00
Riboflavin	0,10	-
Thiamin-HCl	1,00	-
Diverse Supplemente		
D-Glucose	1.000,00	1.000,00
Phenolrot-Na	11,00	15,00
Na-Pyruvat	-	110,00

Verwendete Puffer, Gele und Lösungen

Phosphatpuffer (PBS):

NaCl (8 g/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,16 g/l), KCl (0,2 g/l), K_2PO_4 (0,2 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l)

Phosphatpuffer, Ca^{2+} -haltig, mit erhöhter Mg^{2+} -Konzentration (PBS-Ca):

NaCl (6,68 g/l), NaHCO_3 (2,2 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,14 g/l), KCl (0,04 g/l), CaCl_2 (0,02 g/l)

Polyacrylamid-Sammelgel (5 %):

395 μl Acrylamid (40 % (w/v)), 380 μl TRIS-HCl-Puffer (pH 8,8), 15 μl SDS (10 % (w/v)), 30 μl APS, 3 μl TEMED, 2,2 ml A. dest.

Polyacrylamid Trenngel 1 (13 %):

3,0 ml Acrylamid (40 % (w/v)), 3,0 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 8,8), 82 μl SDS (10 % (w/v)), 80 μl APS, 5 μl TEMED, 3,9 ml A. dest.

Polyacrylamid Trenngel 2 (14 %):

3,5 ml Acrylamid (40 % (w/v)), 3,0 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 8,8), 82 μl SDS (10 % (w/v)), 80 μl APS, 5 μl TEMED, 3,4 ml A. dest.

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie-blue 0,1 % (v/v), Essigsäure 7,5 % (v/v), Methanol 50 % (v/v) in A. dest.

Coomassie-Entfärbelösung:

Essigsäure 5 % (v/v), Methanol 20 % (v/v) in A. dest.

Medium zur Kryokonservierung:

2,75 ml D-MEM, 1,25 ml FKS; 1 ml DMSO

Verwendete Geräte mit Produktbeschreibungen und Bezugsquellen

Zellkultur

Brutschrank, B 5060 Ek / CO ₂	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Sterilbank, Gelaire	Pall Gelman, Dreieich
Bürker-Zählkammer	allg. Laborfachhandel

Optik und Mikroskopie

Inverses Mikroskop, Leitz-Diavert	Leica Mikroskopie, Bensheim
Konfokales Laser-Scan-Mikroskop:	
1. Zeiss Axiovert 135 M mit	Zeiss, Oberkochen
2. Argon-Ionen-Laser, Leistung max. 2 W, Emmission bei: 351, 363, 488 und 514 nm	Coherent Enterprise, Santa Clara, USA
3. Spektral-Filtereinheit Bio-Rad MRC 1024 für Filterung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht (Filterblock NBHS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mikroskop, Leitz-Dialux 20	Leica Mikroskopie, Bensheim
Multiwellplatten-Photometer, iEMS Reader MT	Labsystems GmbH, Frankfurt
Photoautomat MPS 55	Wild, Heerbrugg / Schweiz
Refraktometer	Leica Mikroskopie, Bensheim
Kritischer-Punkt-Trocknungsgerät, Critical Point Drying Device	Polaron, Watford, Groß-Britannien
Sputter-Gerät, Sputtering Device,	Balzers Union Ltd., Wiesbaden

Allgemeine Laborgeräte

Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese-Spannungsversorgung, Pharmacia LKB 200/400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Festwinkelrotor 70 Ti	Beckman Coulter GmbH, München
Kühl-Tischzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Kühl-Tischzentrifuge, Hettich Universal/K2S	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Pumpe, peristaltisch (Minipuls 3)	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Tischzentrifuge, Biofuge B	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Ultrazentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter GmbH, München

UV-Betrachtungsmonitor, TFX-20M,	
Emission: 295 nm Wellenlänge	Vilber-Lourmat, Torcy, Frankreich
Wasserbad, 2204 Multitemp	Pharmacia Amersham Biotech, Freiburg

Reaktorbauteile, eingebundene Geräte und Software

Abfallgefäß aus Glas, 1000 ml, GL 45	Schott Glaswerke, Mainz
Ausgleichsgefäß aus Glas, 100 ml, GL 45	Schott Glaswerke, Mainz
Cytodex 3, Microcarrier aus Dextran-Gel, Collagen-beschichtet, 60 µg/cm ²	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Reaktordeckel aus Teflon	im Hause angefertigt, allg. Laborfachhandel
Druckgase, technisch, Vordruck 1,5 bar,	Messer Griesheim GmbH, Frankfurt
Durchflußmeßzelle, Glas, Gewinde GL-32	Glasbläserei der Justus-Liebig Universität Gießen, FB Chemie
Elektrodenfassung, Teflon, GL-32, GL-25	Bohlender, Lauda
Edelstahlkanülen (A.D. 2 mm.), Luerlock	Unimed SA, Lausanne / Schweiz
Enzym-Automat (Epos Analyzer 5060)	Eppendorf-Netheler-Hinz
Hohlfasermodule Cell-Pharm BR-110 3.150 poröse Hohlfasern (Cellulose) Faser I.D.: 210 µm, W.D. 25 µm, cutoff 10 kDa, Gesamtoberfläche 1.400 cm ²	
KV 12 ml (EKV), Gehäuse aus Polycarbonat	In-Vitro-Systems & Services GmbH, Osterode
Grafische Programmierumgebung HP-VEE Version 5.0	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen
Magnetrührsystem, Ikamag Reo	IKA-Labortechnik, Stauffen i. Br.
Meßkarte, ME-300 ISA-Multi-I/O	Meilhaus Elektronik GmbH, Puchheim
O ₂ -Elektrode, Typ 322	Mettler-Toledo GmbH, Prozeßanalytik, Steinbach Ts.
O ₂ -Meßumformer, Typ 170 % Air	Mettler-Toledo GmbH, Prozeßanalytik, Steinbach Ts.
PC (486 DX, 8 MB RAM)	Peacock AG, Wünnenberg-Haaren
pH-Elektrode InPro 3100 mit PT 1000	Mettler-Toledo GmbH, Prozeßanalytik, Steinbach Ts.
pH-Meter Mettler-Delta 350	Mettler-Toledo GmbH, Prozeßanalytik, Steinbach Ts.
Pumpe, peristaltisch (Minipuls 2 bzw. 3)	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld

Pumpen-Schläuche, ID = 1 mm, Isoversinic	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pumpen-Schläuche, ID = 1 mm, PVC	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pumpen-Schläuche, ID = 3,16 mm, PVC	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Reaktorgefäß 0,1 l	HWS, Mainz
Schläuche, I.D. = 3 mm, W.D. = 1 mm, Teflon	Bohlender, Lauda
Schraubdeckel mit Doppelabgang, Teflon	Bohlender, Lauda
Spritzen für Probennahme (10 ml, 1 ml)	Braun Melsungen
Sterilfilter (cutoff 0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter, Midisart 2000, cutoff 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Temperatursensor PT 100	Mettler-Toledo GmbH, Prozeßanalytik, Steinbach, Ts.
Versorgungsschläuche Rotilabo, Silikon I.D. = 3 mm, W.D. = 2 mm	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Wasserbad, Durchlaufthermostat D1 / L	Haake, Karlsruhe
Zeitschaltuhr	Kleinfeld Labortechnik GmbH & Co, Hannover
Zulaufgefäß aus Glas, 100 ml, GL 45	Schott Glaswerke, Mainz

Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Produktbeschreibungen und

Bezugsquellen

Deckgläser, rund	allg. Laborfachhandel
Edelstahlsieb, Maschenweite 150 µm	im Hause angefertigt, allg. Laborfachhandel
Kryokonservierungsgefäße (2 ml)	Nalge-Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Multiwell-Platten, 12-well (Nunc)	Nalge-Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Objektträger	allg. Laborfachhandel
T-Flasche für Zellkultur, 25 cm ²	Costar, Integra Biosciences, Fernwald
T-Flasche für Zellkultur, 75 cm ²	Costar, Integra Biosciences, Fernwald
T-Flasche für Zellkultur, 80 cm ² (Nunc)	Nalge Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Zentrifugationsfilterhülsen, Omega Nanosep 3 kDa	Pall Gelman, Dreieich
Zentrifugenröhrchen, 28 ml	Nalge-Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden

Verwendete Reagenzien mit Bezugsquellen

A. dest. (Reinstwasseranlage Milli-Q)	Millipore, Eschborn
Acetamylester	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid	Serva Elektrophoresis GmbH Freiburg
Amphotericin B - Gebrauchslösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva Elektrophoresis GmbH Freiburg
Bio-Rad Protein Assay, nach Bradford	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Cacodylsäure, Cacodylat	Merck KGaA, Darmstadt
Collagenase, Typ 1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Collagenlösung Typ 1, rat tail, 4,53 g/l	Collaborative Biomedical Products, Bedford, USA
Coomassie-Reagenz,	
Coomassie brilliant blue G-250	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DABCO, Diazobicyclo-Oktan, (1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-Oktan)	Hoechst AG, Frankfurt
Dabco/Moviol, 1mg/ml	Hoechst AG, Frankfurt
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMSO, Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Elektrophorese-Probenpuffer,	
Roti-Load 1 (reduzierend)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (PAA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fetales Kälberserum (Sigma)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	Serva Elektrophoresis GmbH Freiburg
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutardialdehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Hexokinase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Choriongonadotropin (hCG),	
Ovogest 5000, 9 kU/mg	Intervet GmbH, Tönisvorst
Iliren C, Wirkstoff Tiaprost, (Prostaglandin F _{2α} -Derivat)	Hoechst Roussel Vet GmbH, Wiesbaden
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
K ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Lactat	Roche AG, Mannheim

LMW-Proteinmarker, 94-67-43-30-20-14,4 kDa	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Mimalmedium nach Dulbecco, (Minimal-Essential-Medium, D-MEM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Minimalmedium nach Eagle, (Minimal-Essential-Medium, MEM-E)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Molekulargewichtsmarker, LMW, 94-67-43-30-20-14,4 kDa,	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Molekulargewichtsmarker, RBM-low, 46-30-21,5-14,3-6,5-3,4-2,35 kDa	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Moviol	Hoechst AG, Frankfurt
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NAD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
NADH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
NADPH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt
Nitroblue-Tetrazolium (NBT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS	selbst angesetzt, Reagenzien Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Gebrauchslösung, 100 kU/l, bzw. 100 mg/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Percoll, kolloidale Kieselsäure-Partikel,	
Polyvinylpyrrolidon beschichtet	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Prostaglandin F _{2α} (siehe Iliren C)	
Proteinstandard-Reagenz, Lab-Tol 0,73 - 0,36 - 0,18 - 0,07 - 0,036 g/l	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pyruvat	Roche AG, Mannheim
Rainbow-Marker, RBM-low, 46-30-21,5-14,3-6,5-3,4-2,35 kDa	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sudan-III-Farbstoff	Merck KGaA, Darmstadt
TCA (Trichloressigsäure)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TEMED,	
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

TRIS-HCl-Puffer

(Trishydroxymethylaminomethan)

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Trypsinlösung, 10x Stammlösung 25 g/l

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Anhang III

Rohdaten und Tabellenkalkulationen zu allen im Ergebnisteil dargestellten Kulturexperimenten

Zu Abb. 3.10: Untersuchung der Fähigkeit von Lutealzellen zur Progesteronproduktion

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [h]
75 cm² Flaschen, KV 15 ml (ohne hCG-Stimulation)

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
48	4,6	3,9	4,1	4,5	4,2	4,1
96	1,7	1,9	2,3	2,1	2,4	2,5
144	1,2	1,4	1,7	1,5	1,8	1,5
196	1,3	1,8	1,8	1,6	1,8	1,2

Progesteron Produktionsrate [pmol/d] als Funktion der Kulturdauer [h]
75 cm² Flaschen, KV 15 ml (ohne hCG-Stimulation)

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
48	110,2	91,8	97,5	107,1	100,4	98,3
96	41,3	45,6	54,6	50,8	57,6	60,0
144	28,6	33,2	41,3	35,5	41,7	36,3
196	31,0	42,2	43,4	38,2	42,5	29,8

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [h]
25 cm² Flaschen, KV 5 ml (ohne hCG-Stimulation)

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
48	4,0	3,6	4,4	3,5	0,5	4,1
96	1,4	2,0	1,6	1,5	0,1	1,7
144	0,8	1,1	1,1	1,4	0,3	1,7
196	1,2	1,2	1,9	1,1	0,3	0,8

Progesteron Produktionsrate [pmol/d] als Funktion der Kulturdauer [h]
25 cm² Flaschen, KV 5 ml (ohne hCG-Stimulation)

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
48	32,0	28,5	35,1	27,7	3,9	32,2
96	11,4	15,6	12,8	12,1	1,1	13,7
144	6,1	8,4	8,7	11,1	2,0	13,8
196	9,5	9,6	14,9	8,8	2,1	6,6

Zu Abb. 3.11, 3.12 und 3.13: Wachstumskurven der Lutealzellen in T-Flaschen-Kultur

Zellzählung 1

Kulturintervall [h] nach Aussaat, je 2 Kulturflaschen, 25 cm², KV 5 ml

	Kulturintervall [h]						
	0	25,5	48,5	71,5	93,25	120,5	147
Zellzahl	-	20	43	75	114	132	128
	-	21	45	76	115	138	129
	-	22	43	79	116	143	154
	-	21	44	81	127	128	148
	-	23	45	86	131	131	147
	-	24	46	89	115	150	135
	-	22	49	84	128	148	144
	-	21	46	86	122	132	131
	-	20	46	80	115	128	129
	-	24	47	87	120	152	148
	-	24	48	85	124	147	143
	-	22	48	76	116	149	143
	-	21	44	75	118	133	145
	-	24	41	76	122	145	151
	-	20	45	79	128	150	154
	-	24	47	75	110	151	144
Mittelwert	-	22,1	45,4	80,6	120,1	141,1	142,1
s	-	1,6	2,1	4,9	6,2	9,0	8,9
%-Fehler	-	7,1	4,7	6,1	5,1	6,4	6,3
mittl.%-Fehler	6,0						

Zellzählung 2

Kulturintervall [h] nach Aussaat, je 1 Kulturflasche, 25 cm², KV 5 ml

	Kulturintervall [h]										
	0	4	5	6,5	9	23,3	48,5	71,5	93,25	120,5	147
Zellzahl	17	13	15	16	18	28	52	79	119	139	141
	16	14	16	17	17	27	47	81	114	141	147
	20	14	15	15	18	28	50	76	106	128	145
	19	16	16	16	19	27	49	89	109	126	129
	18	15	15	16	16	28	55	86	118	124	133
	18	14	16	14	17	29	53	86	105	127	138
	17	16	18	16	20	30	54	84	110	141	139
	18	15	17	15	19	28	49	84	108	132	134
	-	-	-	-	-	29	51	86	117	131	144
	-	-	-	-	-	26	49	89	111	129	142
	-	-	-	-	-	28	54	86	115	125	139
	-	-	-	-	-	27	52	79	121	128	147
	-	-	-	-	-	25	53	80	113	135	141
	-	-	-	-	-	28	51	86	120	138	134
	-	-	-	-	-	29	48	87	117	129	128
	-	-	-	-	-	30	49	86	122	131	148
Mittelwert	17,9	14,6	16,0	15,6	18,0	27,9	51,0	84,0	114,1	131,5	139,3
s	1,2	1,1	1,1	0,9	1,3	1,3	2,4	3,8	5,4	5,6	6,3
%-Fehler	7,0	7,3	6,7	5,9	7,3	4,8	4,7	4,6	4,8	4,3	4,5
mittl.%-Fehler	5,6										

Zu Abb. 3.12 und 3.13: Wachstumskurven der Lutealzellen und Progesteronkonzentrationen sowie Progesteronproduktionsraten

Progesteron Konzentration [nM] und Progesteron Produktionsrate als Funktion der Kulturdauer [h]

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Zelldichte $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$	Progesteron		im Intervall [pmol/ Δt]	Produktionsrate	
			Konzentration [nM]	Menge [pmol/2 ml]		spezifisch [pmol/ 10^6 Zellen $\cdot\Delta t$]	spezifisch [pmol/ 10^6 Zellen $\cdot d$]
0,0		1,8	< 0,3	0,6	-	-	-
23,3	23,3	2,8	30,1	60,2	59,6	21,3	21,9
48,5	25,2	5,1	52,8	105,5	45,3	8,9	8,5
71,5	23,0	8,4	95,8	191,6	86,1	10,2	10,7
93,3	21,8	11,4	159,8	319,6	128,0	11,2	12,4
120,5	27,5	13,1	223,4	446,8	127,2	9,7	8,5
147,0	26,5	13,9	281,0	562,0	115,2	8,3	7,5

Zu Abb. 3.14 und 3.15: In situ Gradientenbildung durch Ultrazentrifugation und Fraktionierung der Primärsuspension im Dichtegradienten

In-situ Gradientenbildung durch Zentrifugation (30.000 g, 45 min)

Flüssigkeitssäule [mm]	Brechungsindex [n]	Dichte [ρ]
0,0	1,3619	1,1842
7,5	1,3510	1,1129
11,0	1,3471	1,0874
14,1	1,3453	1,0756
17,1	1,3442	1,0684
20,2	1,3440	1,0671
23,2	1,3425	1,0573
26,3	1,3425	1,0573
29,4	1,3420	1,0540
32,4	1,3418	1,0527
35,5	1,3418	1,0527
38,5	1,3417	1,0520
41,6	1,3410	1,0475
44,7	1,3412	1,0488
47,7	1,3410	1,0475
50,8	1,3408	1,0461
53,8	1,3408	1,0461
56,9	1,3405	1,0442
60,0	1,3398	1,0396
63,0	1,3395	1,0376
66,1	1,3391	1,0350
69,1	1,3385	1,0311
72,2	1,3378	1,0265
75,3	1,3364	1,0173
78,3	1,3352	1,0095

Gradientenzentrifugation vo CL-Zellen (450 g, 25 min)

Flüssigkeitssäule [mm]	Brechungsindex [n]	Dichte [ρ]
0,0	1,3620	1,1820
11,0	1,3550	1,1368
14,1	1,3490	1,0981
18,7	1,3450	1,0723
23,2	1,3435	1,0626
27,8	1,3425	1,0562
32,4	1,3418	1,0516
37,0	1,3410	1,0465
41,6	1,3400	1,0400
46,2	1,3390	1,0336
50,8	1,3380	1,0271
55,4	1,3365	1,0174
60,0	1,3360	1,0142
64,6	1,3355	1,0110
69,1	1,3352	1,0090
73,7	1,3350	1,0078
78,3	1,3350	1,0078
82,9	1,3350	1,0078

Zu Abb. 3.16: Einfluß der Pyruvatsupplementierung auf die Progesteronproduktion

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [h] in Abhängigkeit der Pyruvat-supplementierung [0,48 mM]; Multiwellkultur, 2 ml KV, 12 Ansätze; Ansatz 1-6 ab 169,25 h ohne Pyruvat

Zeit [h]	Ansätze											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	108,0	91,9	100,4	108,3	96,1	96,2	90,3	102,8	96,0	96,4	99,9	72,8
76,25	169,0	148,5	197,2	160,3	185,1	179,3	172,3	223,0	236,0	159,6	180,7	122,6
123,25	196,8	139,8	148,3	187,9	133,2	131,1	171,7	185,1	232,0	161,6	153,6	154,3
169,25	131,3	142,3	135,1	160,8	140,5	130,7	180,1	166,2	205,3	180,3	140,7	140,8
215,25	99,3	85,0	82,8	84,3	94,6	77,0	153,1	171,0	193,7	173,3	147,6	138,4
266,75	48,9	48,1	57,4	54,5	42,4	56,2	150,9	165,9	188,8	160,4	144,0	140,0
314,25	32,9	33,6	50,6	32,2	37,0	33,8	139,4	168,4	168,2	177,0	146,1	122,3
362,25	35,2	34,4	46,6	37,6	36,4	42,0	144,8	169,3	153,6	163,2	147,0	140,8
406	38,4	40,6	64,2	58,8	35,8	35,2	165,3	154,2	146,6	153,5	144,2	132,6
459,75	73,6	69,6	84,5	85,1	60,3	64,9	154,1	146,0	146,3	167,2	141,6	154,5

Progesteron Produktionsrate im KV [fmol/d] als Funktion der Kulturdauer [h] in Abhängigkeit der Pyruvat-supplementierung [0,48 mM]; Multiwellkultur, 2 ml KV, 12 Ansätze; Ansatz 1-6 ab 169,25 h ohne Pyruvat

Zeit [h]	Ansätze											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	216,0	183,9	200,8	216,7	192,2	192,3	180,6	205,5	192,0	192,8	199,8	145,5
76,25	155,3	136,4	181,2	147,3	170,1	164,7	158,3	204,9	216,8	146,6	166,0	112,6
123,25	200,9	142,7	151,5	191,9	136,0	133,9	175,3	189,0	236,9	165,1	156,9	157,6
169,25	137,0	148,5	141,0	167,7	146,6	136,4	187,9	173,4	214,2	188,1	146,8	147,0
215,25	103,6	88,7	86,4	87,9	98,8	80,4	159,8	178,4	202,1	180,8	154,0	144,5
266,75	45,6	44,8	53,5	50,8	39,5	52,4	140,7	154,6	175,9	149,5	134,2	130,5
314,25	33,2	34,0	51,2	32,5	37,4	34,2	140,9	170,2	170,0	178,8	147,6	123,6
362,25	35,2	34,4	46,6	37,6	36,4	42,0	144,8	169,3	153,6	163,2	147,0	140,8
406	42,1	44,6	70,4	64,6	39,3	38,7	181,4	169,1	160,8	168,4	158,2	145,5
459,75	65,7	62,1	75,4	76,0	53,8	57,9	137,6	130,4	130,6	149,3	126,5	138,0

Zu Abb. 3.17: Progesteronproduktion in Abhängigkeit des verwendeten Kulturmediums

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [h] in unterschiedlichen Kulturmedien; Multiwellkultur, 2 ml KV, 6 Ansätze; Wechsel von MEM-E auf D-MEM nach 72 h

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
24	7,3	6,2	9,7	9,2	8,8	7,0
48	9,3	7,7	10,8	10,0	9,8	8,5
72	8,5	8,1	11,1	9,1	10,8	8,8
96	20,6	17,9	18,8	18,6	17,7	17,1
120	24,4	22,7	24,1	22,6	21,3	21,6
144	26,6	24,8	27,0	25,8	23,3	23,5
168	28,2	27,3	27,2	26,6	24,8	25,2

Progesteron Produktionsrate im KV [pmol/d] als Funktion der Kulturdauer [h] in unterschiedlichen Kulturmedien; Multiwellkultur, 2 ml KV, 6 Ansätze; Wechsel von MEM-E auf D-MEM nach 72 h

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
24	14,6	12,3	19,4	18,4	17,5	14,0
48	18,6	15,4	21,6	20,0	19,7	17,0
72	16,9	16,3	22,3	18,1	21,6	17,5
96	41,3	35,9	37,7	37,2	35,4	34,3
120	48,8	45,4	48,2	45,2	42,7	43,2
144	53,2	49,6	54,0	51,5	46,5	47,0
168	56,4	54,6	54,4	53,3	49,6	50,4

Zu Abb. 3.18: Progesteronproduktion unter hormoneller Stimulation durch hCG

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [h];

T-Flaschenkultur, 75 cm², 15 ml, 6 Ansätze; Ansatz 1-3 ab 48 h ohne hCG (4,8 kU/l)

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
48	4,6	3,9	3,3	4,1	4,6	3,7
96	1,9	2,2	1,4	3,1	3,7	3,2
144	1,3	1,6	1,5	4,8	3,5	3,7
192	1,5	1,3	1,3	4,3	4,4	3,4
216	1,5	1,0	0,2	4,8	5,1	4,2

Progesteron Produktionsrate im KV [pmol/d] als Funktion der Kulturdauer [h];

T-Flaschenkultur, 75 cm², 15 ml, 6 Ansätze; Ansatz 1-3 ab 48 h ohne hCG (4,8 kU/l)

Zeit [h]	Ansätze					
	1	2	3	4	5	6
0	-	-	-	-	-	-
48	109,5	93,7	79,2	96,6	108,5	88,5
96	44,4	52,7	33,4	73,7	88,0	77,0
144	30,3	37,9	34,8	113,8	82,5	87,5
192	34,6	30,5	30,1	101,4	104,0	80,6
216	36,3	22,9	3,6	113,8	121,4	100,9

Zu Abb. 3.19 und 3.20: Langzeitkultur von Lutealzellen in Multiwell-Platten (LZT-1)

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	937,15	996,29	1161,34	1093,28
14	249,95	213,06	239,14	297,01
21	308,14	248,04	276,02	247,40
28	190,48	225,46	245,18	257,90
35	64,11	95,40	71,30	65,16
42	13,55	15,49	16,38	14,82
49	8,11	12,85	13,61	12,50
56	13,99	10,21	12,59	12,75
63	7,25	12,97	13,77	13,07
70	6,93	10,49	14,41	12,85
77	13,48	11,77	19,68	20,80

Progesteron-Produktionsrate [nmol/d] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	267,76	284,66	331,81	312,37
14	71,41	60,87	68,32	84,86
21	88,04	70,87	78,86	70,69
28	54,42	64,42	70,05	73,69
35	18,32	27,26	20,37	18,62
42	3,87	4,42	4,68	4,23
49	2,32	3,67	3,89	3,57
56	4,00	2,92	3,60	3,64
63	2,07	3,71	3,93	3,73
70	1,98	3,00	4,12	3,67
77	3,85	3,36	5,62	5,94

Kumulative Produktion [nmol] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	267,76	284,66	331,81	312,37
14	339,17	345,53	400,13	397,23
21	427,21	416,40	479,00	467,91
28	481,63	480,82	549,05	541,60
35	499,95	508,07	569,42	560,22
42	503,82	512,50	574,10	564,45
49	506,14	516,17	577,99	568,02
56	510,14	519,09	581,59	571,66
63	512,21	522,79	585,52	575,40
70	514,19	525,79	589,64	579,07
77	518,04	529,15	595,26	585,01

Zu Abb. 3.21 und 3.22: Langzeitkultur von Lutealzellen in Multiwell-Platten (LZT-2)

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	269,8	283	244,2	286,4
14	256,2	260	259,8	250,8
21	216,2	303,6	244,8	298,4
28	330,6	295,2	241,2	290,8
35	289	351	367	343
42	268	297	296	325
49	192,8	269	228,2	269,8
56	185	231	226,2	259
63	173,2	205,2	228,2	242,6
70	169,2	202,8	195,6	211
77	186,3	214,4	209	205,4
84	137	186,8	147,6	164,4
91	124,2	230,2	199,6	223,4
98	124,2	221,4	190,4	199,5

Progesteron-Produktionsrate [nmol/d] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	77,09	80,86	69,77	81,83
14	73,20	74,29	74,23	71,66
21	61,77	86,74	69,94	85,26
28	94,46	84,34	68,91	83,09
35	82,57	100,29	104,86	98,00
42	76,57	84,86	84,57	92,86
49	55,09	76,86	65,20	77,09
56	52,86	66,00	64,63	74,00
63	49,49	58,63	65,20	69,31
70	48,34	57,94	55,89	60,29
77	53,23	61,26	59,71	58,69
84	39,14	53,37	42,17	46,97
91	35,49	65,77	57,03	63,83
98	35,49	63,26	54,40	57,00

Kumulative Produktion [nmol] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	77,09	80,86	69,77	81,83
14	150,29	155,14	144,00	153,49
21	212,06	241,89	213,94	238,74
28	306,51	326,23	282,86	321,83
35	389,09	426,51	387,71	419,83
42	465,66	511,37	472,29	512,69
49	520,74	588,23	537,49	589,77
56	573,60	654,23	602,11	663,77
63	623,09	712,86	667,31	733,09
70	671,43	770,80	723,20	793,37
77	724,66	832,06	782,91	852,06
84	763,80	885,43	825,09	899,03
91	799,29	951,20	882,11	962,86
98	834,77	1014,46	936,51	1019,86

Zu Abb. 3.23 und 3.24: Langzeitkultur von Lutealzellen in Multiwell-Platten (LZT-3)

Progesteron Konzentration [nM] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	123,40	81,04	99,88	97,16
14	150,70	119,92	121,00	151,20
21	113,60	112,12	114,88	116,72
28	84,84	81,23	70,75	71,68
35	69,07	66,29	65,62	91,70
42	68,64	55,00	51,12	49,76
49	72,23	71,12	89,36	66,60
56	53,16	92,12	57,60	59,16
63	54,84	50,28	38,38	33,60
70	34,12	58,20	34,80	38,60
77	45,20	66,64	42,96	54,44
84	41,48	50,60	35,04	30,48
91	27,60	37,06	29,66	31,65
98	38,73	102,62	40,41	50,49
105	59,00	68,96	7,68	9,13
112	65,16	80,60	2,81	2,76
119	90,36	72,64	2,87	0,70

Progesteron-Produktionsrate [nmol/d] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	35,26	23,15	28,54	27,76
14	43,06	34,26	34,57	43,20
21	32,46	32,03	32,82	33,35
28	24,24	23,21	20,21	20,48
35	19,73	18,94	18,75	26,20
42	19,61	15,71	14,61	14,22
49	20,64	20,32	25,53	19,03
56	15,19	26,32	16,46	16,90
63	15,67	14,37	10,97	9,60
70	9,75	16,63	9,94	11,03
77	12,91	19,04	12,27	15,55
84	11,85	14,46	10,01	8,71
91	7,89	10,59	8,47	9,04
98	11,07	29,32	11,55	14,43
105	16,86	19,70	2,20	2,61
112	18,62	23,03	0,80	0,79
119	25,82	20,75	0,82	0,20

Kumulative Produktion [nmol] als Funktion der Kulturdauer [d]
Multiwellkultur, 2 ml KV, 4 Ansätze

Zeit [d]	Ansätze			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
7	35,26	23,15	28,54	27,76
14	78,31	57,42	63,11	70,96
21	110,77	89,45	95,93	104,31
28	135,01	112,66	116,14	124,79
35	154,75	131,60	134,89	150,99
42	174,36	147,32	149,50	165,20
49	194,99	167,64	175,03	184,23
56	210,18	193,96	191,49	201,14
63	225,85	208,32	202,45	210,74
70	235,60	224,95	212,40	221,76
77	248,51	243,99	224,67	237,32
84	260,37	258,45	234,68	246,03
91	268,25	269,04	243,16	255,07
98	279,32	298,36	254,70	269,50
105	296,17	318,06	256,90	272,11
112	314,79	341,09	257,70	272,89
119	340,61	361,84	258,52	273,09

Zu Abb. 3.26 und 3.32: Verlauf der Konzentrationen an Glucose und Lactat in den Reaktorläufen mit der jeweils niedrigsten Verdünnungsrate

Hohlfaserreaktor: Metabolitkonzentrationen [mM] als Funktion der Kulturdauer [d]

Zeit [d]	Glucose [mM]	Lactat [mM]
0	5,80	1,20
1	5,19	1,24
2	5,17	1,32
3	5,27	1,35
4	5,31	1,37
5	5,25	1,40
6	5,30	1,48
7	5,19	1,28
8	5,13	1,24
9	5,24	1,30
10	5,28	1,27
11	5,25	1,27
12	5,30	1,29
13	5,25	1,24
14	5,01	1,18

Wirbelschichtreaktor: Metabolitkonzentrationen [mM] als Funktion der Kulturdauer [d]

Zeit [d]	Glucose [mM]	Zeit [d]	Lactat [mM]
11,9	5,36	2,0	0,61
12,9	5,41	4,9	0,74
13,9	5,33	5,9	0,68
14,9	5,09	6,9	0,67
15,9	5,01	8,9	0,64
17,1	5,01	11,4	0,59
18,0	5,09	12,3	0,51
19,3	5,22	13,2	0,48
20,9	5,38	14,2	0,41
		15,3	0,43
		16,2	0,51
		19,3	0,47
		21,2	0,38

Zu Abb. 3.27 bis 3.30: Alle Reaktorläufe mit Hohlfasermodule, Progesteronkonzentrationen und Produktionsraten

Reaktorlauf mit Hohlfasermodule HF-1; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate $D = 2/d$, Austauschvolumen pro Tag 184 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0,0	-	-	-	-	-	-	-
28,0	-	5,40	-	-	-	-	-
51,6	23,6	6,20	5,80	0,52	1,07	1,07	1,09
78,6	27,0	5,10	5,65	0,51	1,04	2,11	0,92
105,6	27,0	4,27	4,69	0,42	0,86	2,97	0,77
124,1	18,5	4,80	4,54	0,41	0,83	3,80	1,08
147,9	23,8	3,20	4,00	0,36	0,74	4,54	0,74
172,2	24,3	3,45	3,33	0,30	0,61	5,15	0,60
191,7	19,5	3,97	3,71	0,33	0,68	5,83	0,84
214,7	23,0	3,87	3,92	0,35	0,72	6,56	0,75
236,2	21,5	2,85	3,36	0,30	0,62	7,17	0,69
261,2	25,0	2,30	2,58	0,23	0,47	7,65	0,45
287,9	26,8	1,82	2,06	0,19	0,38	8,03	0,34
313,5	25,6	1,74	1,78	0,16	0,33	8,35	0,31
337,5	24,0	0,82	1,28	0,12	0,24	8,59	0,24
360,8	23,3	0,65	0,74	0,07	0,14	8,72	0,14

Reaktorlauf mit Hohlfasermodule HF-2; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate $D = 2/d$, Austauschvolumen pro Tag 184 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0,0	-	-	-	-	-	-	-
25,3	-	1,78	-	-	-	-	-
49,9	24,6	1,28	1,53	0,14	0,28	0,28	0,27
73,2	23,3	0,80	1,04	0,09	0,19	0,47	0,20
97,5	24,3	1,32	1,06	0,10	0,20	0,67	0,19
120,8	23,3	0,61	0,97	0,09	0,18	0,85	0,18
144,8	24,0	0,91	0,76	0,07	0,14	0,99	0,14
168,3	23,5	1,01	0,96	0,09	0,18	1,16	0,18
193,3	25,0	0,59	0,80	0,07	0,15	1,31	0,14
216,6	23,3	0,78	0,69	0,06	0,13	1,44	0,13
238,0	21,5	0,59	0,69	0,06	0,13	1,56	0,14
264,0	26,0	1,00	0,80	0,07	0,15	1,71	0,14
287,3	23,3	0,38	0,69	0,06	0,13	1,83	0,13
310,8	23,5	0,78	0,58	0,05	0,11	1,94	0,11
335,1	24,3	0,61	0,70	0,06	0,13	2,07	0,13
359,7	24,6	0,52	0,57	0,05	0,10	2,17	0,10
384,5	24,8	0,96	0,74	0,07	0,14	2,31	0,13
408,5	24,0	0,78	0,87	0,08	0,16	2,47	0,16

Reaktorlauf mit Hohlfasermodule HF-3; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate $D = 2/d$, Austauschvolumen pro Tag 184 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0,0	-	-	-	-	-	-	-
28,0	-	3,02	-	-	-	-	-
53,0	25	1,11	2,07	0,19	0,38	0,38	0,36
75,0	22	1,47	1,29	0,12	0,24	0,62	0,26
101,5	26,5	2,42	1,95	0,18	0,36	0,98	0,32
126,0	24,5	2,38	2,40	0,22	0,44	1,42	0,43
147,5	21,5	2,30	2,34	0,21	0,43	1,85	0,48
171,5	24	1,95	2,13	0,19	0,39	2,24	0,39
194,0	22,5	1,60	1,78	0,16	0,33	2,56	0,35
214,5	20,5	1,35	1,48	0,13	0,27	2,84	0,32
242,0	27,5	1,53	1,44	0,13	0,26	3,10	0,23
295,5	53,5	1,68	1,61	0,14	0,30	3,40	0,13
315,5	20	1,53	1,61	0,14	0,30	3,69	0,35
339,5	24	1,61	1,57	0,14	0,29	3,98	0,29
363,5	24	1,54	1,58	0,14	0,29	4,27	0,29
387,0	23,5	1,73	1,64	0,15	0,30	4,57	0,31
411,0	24	1,30	1,52	0,14	0,28	4,85	0,28

Reaktorlauf mit Hohlfasermodule HF-4; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate $D = 1/d$, Austauschvolumen pro Tag 92 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0,0	-	-	-	-	-	-	-
25,0	-	4,30	-	-	-	-	-
50,0	25	1,97	3,14	0,28	0,29	0,29	0,28
73,5	23,5	2,10	2,04	0,18	0,19	0,48	0,19
97,5	24	2,60	2,35	0,21	0,22	0,69	0,22
122,0	24,5	2,00	2,30	0,21	0,21	0,90	0,21
147,0	25	2,40	2,20	0,20	0,20	1,11	0,19
169,0	22	2,20	2,30	0,21	0,21	1,32	0,23
196,0	27	1,90	2,05	0,18	0,19	1,51	0,17
223,0	27	1,50	1,70	0,15	0,16	1,66	0,14
247,0	24	1,70	1,60	0,14	0,15	1,81	0,15
275,0	28	1,95	1,83	0,16	0,17	1,98	0,14
296,0	21	1,38	1,67	0,15	0,15	2,13	0,18
320,0	24	1,98	1,68	0,15	0,15	2,29	0,15
345,0	25	2,47	2,23	0,20	0,20	2,49	0,20
367,5	22,5	2,89	2,68	0,24	0,25	2,74	0,26
393,5	26	2,45	2,67	0,24	0,25	2,98	0,23
417,5	24	2,64	2,55	0,23	0,23	3,22	0,23

Reaktorlauf mit Hohlfasermodul HF-5; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate $D = 1/d$, Austauschvolumen pro Tag 92 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0	-	-	-	-	-	-	-
23,3	-	4,10	-	-	-	-	-
47,3	24,0	1,68	2,89	0,26	0,27	0,27	0,27
72,8	25,5	2,56	2,12	0,19	0,20	0,46	0,18
97,4	24,6	2,97	2,77	0,25	0,25	0,72	0,25
121,9	24,5	3,58	3,28	0,29	0,30	1,02	0,30
142,9	21,0	3,69	3,64	0,33	0,33	1,35	0,38
166,9	24,0	3,86	3,78	0,34	0,35	1,70	0,35
191,9	25,0	3,15	3,51	0,32	0,32	2,02	0,31
218,9	27,0	2,89	3,02	0,27	0,28	2,30	0,25
247,4	28,5	3,58	3,24	0,29	0,30	2,60	0,25
272,7	25,3	4,05	3,82	0,34	0,35	2,95	0,33
298,2	25,5	4,22	4,14	0,37	0,38	3,33	0,36
319,2	21,0	4,57	4,40	0,40	0,40	3,73	0,46
345,2	26,0	4,76	4,67	0,42	0,43	4,16	0,40
369,2	24,0	4,68	4,72	0,42	0,43	4,60	0,43
396,2	27,0	4,38	4,53	0,41	0,42	5,01	0,37
420,7	24,5	3,65	4,02	0,36	0,37	5,38	0,36
447	26,3	3,01	3,33	0,30	0,31	5,69	0,28
471,3	24,3	2,80	2,91	0,26	0,27	5,96	0,26
498,3	27,0	2,96	2,88	0,26	0,26	6,22	0,24

Reaktorlauf mit Hohlfasermodul HF-6; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate $D = 1/d$, Austauschvolumen pro Tag 92 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0,0	-	-	-	-	-	-	-
24,0	-	4,68	-	-	-	-	-
48,5	24,5	1,96	3,32	0,30	0,31	0,31	0,30
72,8	24,3	2,36	2,16	0,19	0,20	0,50	0,20
97,4	24,6	2,34	2,35	0,21	0,22	0,72	0,21
122,4	25	2,56	2,45	0,22	0,23	0,95	0,22
146,4	24	2,89	2,73	0,25	0,25	1,20	0,25
169,9	23,5	2,12	2,51	0,23	0,23	1,43	0,24
192,9	23	2,04	2,08	0,19	0,19	1,62	0,20
217,4	24,5	2,95	2,50	0,22	0,23	1,85	0,22
241,0	23,6	2,68	2,82	0,25	0,26	2,11	0,26
265,0	24	3,12	2,90	0,26	0,27	2,37	0,27
290,0	25	3,24	3,18	0,29	0,29	2,67	0,28
316,5	26,5	3,35	3,30	0,30	0,30	2,97	0,27
338,5	22	3,69	3,52	0,32	0,32	3,29	0,35
365,5	27	3,98	3,84	0,35	0,35	3,65	0,31
389,5	24	3,65	3,82	0,34	0,35	4,00	0,35
414,1	24,6	3,50	3,58	0,32	0,33	4,33	0,32
438,6	24,5	3,27	3,39	0,30	0,31	4,64	0,31
463,6	25	3,11	3,19	0,29	0,29	4,93	0,28
489,6	26	3,25	3,18	0,29	0,29	5,22	0,27
514,1	24,5	3,02	3,14	0,28	0,29	5,51	0,28

Zu Abb. 3.31 bis 3.42: Alle Reaktorläufe mit Wirbelschichtmodul, Progesteronkonzentrationen und Produktionsraten

Reaktorlauf mit Wirbelschichtmodul WS-1; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate im kontinuierlichen Betrieb $D = 1/d$, Austauschvolumen pro Tag 90 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	Produktionsrate im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nM/d] [nmol/d]
0,0	-	-	-	-	-	-	-
24,0	-	3,10	-	-	-	-	-
46,0	22,0	2,21	2,66	0,24	0,24	0,24	0,26
70,5	24,5	3,25	2,73	0,25	0,25	0,48	0,24
95,0	24,5	2,84	3,05	0,27	0,27	0,76	0,27
118,0	23,0	2,39	2,62	0,24	0,24	0,99	0,25
143,5	25,5	2,77	2,58	0,23	0,23	1,23	0,22
168,5	25,0	2,71	2,74	0,25	0,25	1,47	0,24
193,0	24,5	2,35	2,53	0,23	0,23	1,70	0,22
217,5	24,5	2,53	2,44	0,22	0,22	1,92	0,22
241,5	24,0	2,41	2,47	0,22	0,22	2,14	0,22
264,5	23,0	1,79	2,10	0,19	0,19	2,33	0,20
288,3	23,8	1,58	1,69	0,15	0,15	2,48	0,15
315,0	26,7	0,65	1,12	0,10	0,10	2,58	0,09
337,0	22,0	0,90	0,78	0,07	0,07	2,65	0,08
360,5	23,5	0,54	0,72	0,06	0,06	2,72	0,07
388,0	27,5	0,69	0,62	0,06	0,06	2,77	0,05
410,0	22,0	0,85	0,77	0,07	0,07	2,84	0,08
433,0	23,0	0,62	0,74	0,07	0,07	2,91	0,07

Reaktorlauf mit Wirbelschichtmodul WS-2; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate im kontinuierlichen Betrieb $D = 0,5/d$, Austauschvolumen pro Tag 45 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	Produktionsrate im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]				
0,0	-	-	-	-	-	-	-
22,5	-	6,19	-	-	-	-	-
49,0	26,5	4,68	5,44	0,49	0,24	0,24	0,22
72,0	23,0	3,99	4,34	0,39	0,20	0,44	0,20
96,0	24,0	3,11	3,55	0,32	0,16	0,60	0,16
121,5	25,5	4,30	3,71	0,33	0,17	0,77	0,16
143,0	21,5	3,80	4,05	0,36	0,18	0,95	0,20
155,5	12,5	4,20	4,00	0,36	0,18	1,13	0,35
170,0	14,5	5,00	4,60	0,41	0,21	1,34	0,34
180,5	10,5	4,40	4,70	0,42	0,21	1,55	0,48
192,0	11,5	5,10	4,75	0,43	0,21	1,76	0,45
202,5	10,5	3,20	4,15	0,37	0,19	1,95	0,43
215,0	12,5	4,70	3,95	0,36	0,18	2,13	0,34
227,0	12,0	5,20	4,95	0,45	0,22	2,35	0,45
240,5	13,5	4,10	4,65	0,42	0,21	2,56	0,37
253,0	12,5	4,00	4,05	0,36	0,18	2,74	0,35
265,0	12,0	3,40	3,70	0,33	0,17	2,91	0,33
277,0	12,0	4,00	3,70	0,33	0,17	3,07	0,33
288,5	11,5	5,00	4,50	0,41	0,20	3,27	0,42
303,0	14,5	5,10	5,05	0,45	0,23	3,50	0,38
312,0	9,0	3,40	4,25	0,38	0,19	3,69	0,51
325,0	13,0	3,20	3,30	0,30	0,15	3,84	0,27
336,5	11,5	2,70	2,95	0,27	0,13	3,97	0,28
350,0	13,5	3,00	2,85	0,26	0,13	4,10	0,23
361,5	11,5	2,30	2,65	0,24	0,12	4,22	0,25
373,0	11,5	3,60	2,95	0,27	0,13	4,35	0,28
385,0	12,0	3,40	3,50	0,32	0,16	4,51	0,32
396,5	11,5	2,70	3,05	0,27	0,14	4,65	0,29
407,0	10,5	2,80	2,75	0,25	0,12	4,77	0,28
417,0	10,0	1,30	2,05	0,18	0,09	4,87	0,22
433,0	16,0	4,10	2,70	0,24	0,12	4,99	0,18
443,5	10,5	1,70	2,90	0,26	0,13	5,12	0,30
456,5	13,0	2,40	2,05	0,18	0,09	5,21	0,17
469,0	12,5	2,10	2,25	0,20	0,10	5,31	0,19
480,5	11,5	2,50	2,30	0,21	0,10	5,41	0,22
493,0	12,5	3,10	2,80	0,25	0,13	5,54	0,24
501,5	8,5	2,00	2,55	0,23	0,11	5,66	0,32
517,0	15,5	1,90	1,95	0,18	0,09	5,74	0,14
529,0	12,0	2,20	2,05	0,18	0,09	5,84	0,18
539,5	10,5	2,30	2,25	0,20	0,10	5,94	0,23
551,5	12,0	2,70	2,50	0,23	0,11	6,05	0,23
564,0	12,5	1,40	2,05	0,18	0,09	6,14	0,18

Reaktorlauf mit Wirbelschichtmodul WS-3; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate im kontinuierlichen Betrieb $D = 0,33/d$, Austauschvolumen pro Tag 29,7 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	Produktionsrate im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]				
0	-	-	-	-	-	-	-
22	-	7,45	-	-	-	-	-
48	26	9,30	8,38	0,75	1,85	1,85	1,71
61	13	12,40	10,85	0,98	3,10	4,95	5,72
69	8	16,60	14,50	1,31	4,20	9,15	12,60
83	14	18,61	17,61	1,58	0,53	9,68	0,91
92	9	18,40	18,51	1,67	0,56	10,23	1,48
106	14	16,82	17,61	1,58	0,53	10,76	0,91
114	8	14,85	15,84	1,43	0,48	11,24	1,43
130	16	15,25	15,05	1,35	0,45	11,69	0,68
154	24	17,51	16,38	1,47	0,49	12,18	0,49
176	22	16,00	16,76	1,51	0,50	12,68	0,55
190	14	16,00	16,00	1,44	0,48	13,16	0,82
199	9	17,00	16,50	1,49	0,50	13,66	1,32
213	14	12,00	14,50	1,31	0,44	14,09	0,75
224	11	15,00	13,50	1,22	0,41	14,50	0,88
239	15	16,00	15,50	1,40	0,47	14,96	0,74
252	13	13,67	14,84	1,34	0,45	15,41	0,82
260	8	11,90	12,79	1,15	0,38	15,79	1,15
274	14	10,82	11,36	1,02	0,34	16,13	0,58
282	8	12,49	11,66	1,05	0,35	16,48	1,05
297	15	11,31	11,90	1,07	0,36	16,84	0,57
321	24	8,95	10,13	0,91	0,30	17,14	0,30
346	25	11,11	10,03	0,90	0,30	17,44	0,29
357	11	8,00	9,56	0,86	0,29	17,73	0,63
366	9	7,08	7,54	0,68	0,23	17,96	0,60
379	13	7,48	7,28	0,66	0,22	18,17	0,40
388	9	8,46	7,97	0,72	0,24	18,41	0,64
403	15	9,54	9,00	0,81	0,27	18,68	0,43
422	19	7,08	8,31	0,75	0,25	18,93	0,31

Reaktorlauf mit Wirbelschichtmodul WS-4; Verlauf der Progesteronkonzentration [nM] und der Produktionsrate im Kulturvolumen als Funktion der Kulturdauer [h]

Verdünnungsrate im kontinuierlichen Betrieb $D = 0,33/d$, Austauschvolumen pro Tag 29,7 ml/d

Zeit [h]	Zeitintervall [h]	Progesteron		Menge im Kulturvolumen [nmol]	im Intervall [nmol/ Δt]	Produktionsrate	
		Konzentration [nM]	Mittelwert [nM]			kumulativ [nmol]	pro Tag [nmol/d]
0	-	-	-	-	-	-	-
21,5	-	12,70	-	-	-	-	-
30,5	9	20,80	16,75	1,51	8,10	8,10	21,60
45	14,5	22,85	21,83	1,96	2,05	10,15	3,39
55	10	24,00	23,43	2,11	1,15	11,30	2,76
69,5	14,5	25,11	24,56	2,21	1,11	12,41	1,84
100	30,5	22,93	24,02	2,16	0,79	13,20	0,62
118	18	23,88	23,41	2,11	0,77	13,98	1,03
127,5	9,5	27,32	25,60	2,30	0,84	14,82	2,13
141	13,5	20,24	23,78	2,14	0,78	15,60	1,40
150,5	9,5	25,08	22,66	2,04	0,75	16,35	1,89
165	14,5	23,04	24,06	2,17	0,79	17,15	1,31
173,5	8,5	23,78	23,41	2,11	0,77	17,92	2,18
191	17,5	22,96	23,37	2,10	0,77	18,69	1,06
196,5	5,5	23,04	23,00	2,07	0,76	19,45	3,31
213	16,5	20,08	21,56	1,94	0,71	20,16	1,03
221	8	21,75	20,92	1,88	0,69	20,85	2,07
236	15	20,19	20,97	1,89	0,69	21,54	1,11
273	37	14,97	17,58	1,58	0,58	22,12	0,38
286	13	12,19	13,58	1,22	0,45	22,57	0,83
294	8	12,41	12,30	1,11	0,41	22,98	1,22
309	15	8,66	10,54	0,95	0,35	23,32	0,56
317,5	8,5	7,99	8,33	0,75	0,27	23,60	0,78
333	15,5	7,05	7,52	0,68	0,25	23,85	0,38
341	8	6,16	6,61	0,59	0,22	24,07	0,65
357	16	4,68	5,42	0,49	0,18	24,24	0,27
366	9	4,00	4,34	0,39	0,14	24,39	0,38
381	15	3,99	4,00	0,36	0,13	24,52	0,21
389,5	8,5	3,52	3,76	0,34	0,12	24,64	0,35
411	21,5	3,11	3,32	0,30	0,11	24,75	0,12
433	22	2,53	2,82	0,25	0,09	24,85	0,10
462,5	29,5	1,67	2,10	0,19	0,07	24,92	0,06
480	17,5	1,59	1,63	0,15	0,05	24,97	0,07
487,5	7,5	1,49	1,54	0,14	0,05	25,02	0,16
502	14,5	1,32	1,41	0,13	0,05	25,07	0,08
509	7	2,20	1,76	0,16	0,06	25,12	0,20